

**«In-vitro Vergleiche der antimikrobiellen Wirkung  
von pflanzlichen Vielstoffgemischen, artifiziellen  
Stoffkombinationen und phytogenen  
Monosubstanzen am Beispiel des ätherischen Öls  
von *Thymus vulgaris*».**

---

Dissertation

zur

Erlangung der naturwissenschaftlichen Doktorwürde  
(Dr. sc. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Zürich

von

«Felix Iten»

von/aus

«Unterägeri (ZG)»

**Promotionskomite**

Prof. Dr. Enrico Martinoia (Vorsitz)

Prof. Dr. med. Reinhard Saller (Leitung der Dissertation)

Prof. Dr. Leo Eberl

**Gutachter**

Prof. Dr. Jürgen Reichling (1. Gutachter)

**Zürich, 2010**

# 1 Inhalt

1	Inhalt.....	1
2	Abkürzungsverzeichnis .....	5
3	Einführung.....	6
3.1	Problemstellung und Zielsetzung .....	7
4	Die historische Bedeutung ätherischer Öle .....	8
5	Charakterisierung von Vielstoffgemischen.....	12
5.1	Kombinationseffekte .....	13
5.1.1	Definition und Begriffsvielfalt .....	14
5.2	Klassifizierung von Kombinationseffekten.....	15
5.3	Quantitative Aspekte stofflicher Interaktionen .....	16
5.3.1	Berechnung der maximalen Anzahl Interaktionen.....	16
5.3.2	Die Bedeutung der Teile für das Ganze .....	17
5.3.3	Vielstoffgemische im Experiment.....	19
5.3.4	Die koalierte Wirkung – der Problemfall .....	19
5.4	Qualitative Aspekte der Interaktionsmechanismen.....	21
5.5	Nutzen und Risiken stofflicher Wechselwirkungen.....	22
6	Material und Methoden .....	24
6.1	Der Garten-Thymian ( <i>Thymus vulgaris</i> ) .....	24
6.1.1	Herkunft und Verbreitung .....	25
6.1.2	Die Chemotypen und ihre Inhaltsstoffe.....	25
6.1.3	Das Thymian Öl.....	27
6.1.4	Traditionelle und moderne Anwendungen des Thymians.....	29
6.1.5	Kultivierung und Ernte .....	32
6.2	Die Farfalla-Öle.....	33
6.2.1	Analytik der Farfalla-Öle.....	34
6.2.2	Charakterisierung der Monosubstanzen .....	38
6.2.3	Vorbereitung der ätherischen Öle.....	40
6.3	Antibiotika .....	41
6.4	Mikroorganismen.....	41

6.4.1	Staphylococcus aureus.....	42
6.4.2	Staphylococcus epidermidis .....	42
6.4.3	Staphylococcus saprophyticus.....	43
6.4.4	Klebsiella pneumoniae (Enterobakterien) .....	43
6.4.5	Escherichia coli (Enterobakterien) .....	43
6.4.6	Candida albicans.....	44
6.5	Methodik.....	44
6.5.1	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) .....	44
6.5.2	Bestimmung der Minimalen Bakteriziden Konzentration (MBK). .....	45
6.5.3	Die Checkerboard-Methode .....	45
6.5.3.1	Der Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI).....	47
6.5.3.2	Berechnung der FICI-Werte.....	47
6.5.3.3	Zur Auswahl der Messpunkte .....	49
6.5.3.4	Test auf Signifikanz .....	50
6.5.3.5	Isobologramme.....	50
6.5.3.6	Trendlinien .....	52
6.5.3.7	Randeffekte und Randpunkte .....	52
6.5.3.8	Die Bedeutung der Mischungsverhältnisse .....	53
6.5.3.9	Grenzen der Darstellung mittels Isobolgrammen.....	54
6.5.4	Die Time-Kill-Methode .....	55
6.5.4.1	Artifiziellen Kombinationen .....	56
6.5.5	Adaptationsversuche.....	57
6.5.5.1	Adaptationsvermögen und Wachstumsrate.....	57
6.6	Statistische Methoden.....	58
6.6.1	MHK-Werte.....	58
6.6.2	Mittelwertsvergleich der Variationskoeffizienten (Vk) .....	58
6.6.3	MHK & Tween-80.....	58
6.6.4	Konfidenzintervalle der FICI-Werte .....	58
6.7	Nachweisgrenze & minimale Inokulumdichte .....	59
7	Etablierung der MHK und MBK Bestimmung .....	60
7.1	Löslichkeit .....	60
7.1.1	Agar und Tween-80 im Vergleich.....	60
7.1.2	Mischverfahren im Vergleich.....	61
7.2	Inokulumeffekte.....	63
7.3	Abdeckfolien .....	64
7.4	Stabilität der ätherischen Öle.....	65

8	Resultate .....	67
8.1	Zur Analytik der Farfalla Öle .....	67
8.2	Die MHK der ätherischen Öle .....	68
8.2.1	Paarweiser Vergleich der MHK-Mittelwerte .....	71
8.2.2	Zusammenfassung der MHK-Werte .....	74
8.2.3	Vergleich der MHK- und MBK-Werte .....	75
8.2.4	MHK-Werte und Haltbarkeit der Thymianextrakte .....	76
8.3	Resultate der Checkerboard-Assays .....	77
8.3.1	Mischungsverhältnisse der ätherischen Öle .....	77
8.3.2	Mischungsverhältnisse der Monosubstanzen .....	77
8.3.3	Zusammenfassung der Checkerboard-Resultate .....	85
8.3.4	Mischungsbereiche mit additiven Effekten .....	86
8.4	Time-Kill-Resultate .....	87
8.4.1	Konzentrationsabhängigkeit der Absterberate .....	87
8.4.2	Artifizielle Kombinationen .....	91
8.4.3	Zusammenfassung der Resultate .....	95
8.5	Adaptationsversuche .....	96
8.5.1	Rückadaptation .....	98
9	Diskussion .....	99
9.1	Kombinationswirkungen - Zum Stand der Forschung .....	99
9.2	Methodische Ergänzungen zur Checkerboard-Methode .....	100
9.2.1	Interpretation der Checkerboard-Ergebnisse .....	102
9.2.2	Interpretation der Time-Kill-Ergebnisse .....	103
9.2.3	Artifizielle Wirkstoffkombinationen im TK-Assay .....	105
9.2.4	Vergleichbarkeit der Checkerboard- & Time-Kill-Methode .....	106
9.2.5	Erweiterung des Definitionsbereichs für Synergismus der TKM .....	109
9.3	Die klinische Bedeutung der Ergebnisse .....	110
9.4	Zur Wasserlöslichkeit von Thymol und Carvacrol .....	112
9.5	Spekulationen zum Wirkmechanismus .....	114
9.6	MHK- & MBK-Werte .....	116
9.6.1	MHK-Werte und LD <sub>50</sub> -Werte .....	116
9.6.2	MHK des Carvacrolöls und der Monosubstanzen .....	117

9.6.3	Das Wirtsspektrum .....	117
9.6.4	Die Empfindlichkeit der Mikroorganismen.....	118
9.6.5	Die MBK der ätherischen Öle .....	118
9.7	Adaptationsversuche.....	119
10	Zusammenfassung.....	120
11	Summary .....	123
12	Anhang .....	126
12.1	"Analysenzertifikat" Farfalla .....	126
12.2	Ergänzungen zu den Berechnungen.....	127
12.2.1	Abschätzung der Chemotypenanteile im Farfallaöl.....	127
12.2.2	Mischungsverhältnisse in den ätherischen Ölen .....	127
12.2.3	Tabelle mit Messwerten eines Checkerboard-Assay .....	128
12.2.4	Berechnung der Kombinationsmöglichkeiten von n Inhaltsstoffen 129	
12.2.5	Ökonomische Verfahren zum Testen von Kombinationen mit mehr als 2 Stoffen (nach Berenbaum 1978).....	130
12.2.6	Verdünnungsreihen eines Time-Kill-Assay.....	131
12.3	Heimische Pflanzen mit Carvacrol bzw. Thymol .....	132
13	Literatur .....	133

## 2 Abkürzungsverzeichnis

Ac	Artifizielle Kombination (CTL = Carvacrol & Thymol & Linalool)
Ca	Candida albicans
cfu	colony forming units
ChA	Chequerboard-Assay
ChM	Chequerboard-Methode
CI	Konfidenzintervall
CT	Carvacrol & Thymol (artifizielle Kombination Ac II)
CTL	Carvacrol & Thymol & Linalool (artifizielle Kombination Ac III)
Cve	Carvacrolöl
Cvm	Carvacrol Monosubstanz (Fluka)
Ec	Escherichia coli
FICI	Fractional Inhibitory Concentration Index
KI	Klebsiella
Loe	Linalool-Öl (Farfalla)
Lom	Linalool Monosubstanz (Fluka)
MBK	Minimale Bakterizide Konzentration (Keimzahlreduktion $\geq 10^{-3}$ cfu/ml)
MH	Müller-Hinten-Broth
MH-A	Müller-Hinten-Broth mit 0.05% Agar
MHK	Minimale Hemmkonzentration (bakteriostatisch)
MO	Mikroorganismus
Sap	Staphylococcus saprophyticus
Sta	Staphylococcus aureus
Ste	Staphylococcus epidermidis
Sterr.	Standardfehler (Fehler des Mittelwertes)
The	Thymol-Öl (Farfalla)
Thm	Thymol Monosubstanz (Fluka)
TKM	Time-Kill-Methode
V <sub>k</sub>	Variationskoeffizient

### 3 Einführung

Pflanzliche Arzneimittel (Phytopharmaka) sind natur- und definitionsgemäss Vielstoffgemische. Der Vielstoffcharakter der Phytopharmaka und die Tatsache, dass sie keine synthetischen Verbindungen enthalten, stellen die wichtigsten Unterschiede im Vergleich zu schulmedizinischen Arzneimitteln dar. Darüber hinaus gelten pflanzliche Arzneimittel als weitgehend „naturbelassen“, obwohl empfindliche Inhaltsstoffe auf dem Weg von der Ernte über die Verarbeitung zum Fertigarzneimittel natürlicherweise chemischen Prozessen, wie Oxidationen und Hydrolysen ausgesetzt sind und sich das Inhaltsspektrum dadurch verändern kann. Eine schnelle und schonende Verarbeitung oder Trocknung der Frischpflanzen gehört deshalb zur „Good Manufacturing Practice“, wenn natürliche Fermentierungsprozesse nicht von vornherein erwünscht sind. Der Vielstoffcharakter ist aber nicht nur ein typisches Merkmal der pflanzlichen Arzneimittel, sondern auch eine unabdingbare Voraussetzung für Wechselwirkungen zwischen den Inhaltsstoffen, bzw. für multiple Interaktionen mit Zellbestandteilen, die sich unter anderem in Form von synergistischen oder antagonistischen Effekten manifestieren können.

Die systematische Suche nach synergistisch wirkenden Arzneistoffkombinationen ist mittlerweile zu einem unverzichtbaren Bestandteil bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten und in der Krebsforschung geworden und hat sich darüber hinaus als ein wichtiges Instrument der Systembiologie etabliert [1-3]. Eine der ersten Publikationen zur Interaktion von zwei Substanzen war die Arbeit von Thomas Richard Fraser aus dem Jahre 1872 [4], die sich mit dem Antagonismus zwischen Physostigmin und Atropin befasste. Zwischen 1926 - 27 publizierten Loewe et al. Arbeiten zum Antagonismus zwischen Analgetika und Barbituraten und zum Synergismus zwischen den Inhaltsstoffen von Strophanthus und Digitalis. Bereits kurz nach Einführung der ersten Antibiotika in den frühen 40er Jahren des 20. Jahrhunderts traten die ersten Resistenzen auf, die damals schon das Interesse an Antibiotika-Kombinationen mit synergistischen Wirkungen weckten [5]. Eine weitere wissenschaftliche Disziplin, die sich in den letzten Jahrzehnten intensiv mit Interaktionen beschäftigte, ist die Ökotoxikologie, die stoffliche Kombinationswirkungen auf Ökosysteme und ihre Lebewesen untersucht. Heute sind moderne Kombinationspräparate für die unterschiedlichsten Indikationen auf dem Markt. Beispiele sind das Antibiotikum Augmentin (Amoxicillin & K-Clavulanate), Advair gegen Asthma, Combivir gegen HIV und Advicor gegen Hypercholesterinämie [3].

Ein Grund, weshalb die Suche nach besonders wirksamen und verträglichen Arzneimittelkombinationen nicht schon früher eingesetzt hat, und pflanzliche Vielstoffgemische nicht viel intensiver beforscht sind, liegt am enormen Aufwand der damit verbunden ist und der erst durch die modernen



automatischen Screening-Verfahren des "combination High-Throughput Screening" (cHTS) auf ein vernünftiges Mass reduziert werden konnte.

### **3.1 Problemstellung und Zielsetzung**

Ätherische Öle sind verglichen mit den meisten Extrakten relativ homogene Vielstoffgemische. Sie bestehen überwiegend aus Monoterpenen, Phenylpropanen und Sesquiterpenen. Obwohl die Vielfalt dieser Stoffgruppen gross ist und das Spektrum der pharmakologischen Wirkungen breit, stellt sich die Frage, ob es gute Gründe für die Verwendung dieser Vielstoffgemische gibt oder ob die aktiven Monosubstanzen vorzuziehen wären. Im Vordergrund stand deshalb die Frage, ob sich zwischen den antimikrobiell aktiven Inhaltsstoffen und dem Vielstoffgemisch Thymianöl Unterschiede in der Wirkstärke und im zeitlichen Verlauf der Absterbekinetik finden lassen. Pina-Vaz et al. [6] zeigten 2004, dass Inhaltsstoffe des Thymianöls bei Candida Arten synergistische Wirkung entfalten können.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Thymianöl des Chemotyps Carvacrol gehört mit seinen phenolhaltigen Komponenten zu den am stärksten antibiotisch wirkenden ätherischen Ölen [7-10]. Es eignet sich deshalb besonders gut, um die Zusammenhänge zwischen der antibiotischen Wirksamkeit und den beteiligten Wirkstoffen zu untersuchen. Penalver et al. 2005 [11] konnten zeigen, dass die antimikrobielle Wirkung mit zunehmendem Anteil phenolischer Inhaltsstoffe steigt.

Die Checkerboard-Methode war die Methode der Wahl zum Auffinden synergistischer bzw. antagonistischer Kombinationswirkungen. Es wurden Kombinationen der beiden Chemotypen und Kombinationen der Hauptinhaltsstoffe der beiden Chemotypen an sechs unterschiedlichen Mikroorganismen auf synergistische bzw. antagonistische Interaktionen hin untersucht. Mit Hilfe der Time-Kill Methode wurde der zeitliche Verlauf der Absterberate erfasst. Die Vergleichbarkeit der beiden Methoden, zur Beurteilung synergistischer bzw. antagonistischer Interaktionen, wurde verschiedentlich in Frage gestellt. Die beiden Methoden werden deshalb einem qualitativen und quantitativen Vergleich unterzogen und ihre jeweiligen Stärken und Schwächen evaluiert.

Es ist bekannt, dass sich Mikroorganismen bis zu einem gewissen Grad an subletale Dosen ätherischen Öles anpassen vermögen [12]. In Kurzzeitadaptationen wurde untersucht, wie weit sich die sechs Mikroorganismen an steigende Konzentrationen des Thymianöls anpassen vermögen und wie stabil diese Anpassungsleistung in Abwesenheit des Stressfaktors Thymianöl ist.

## 4 Die historische Bedeutung ätherischer Öle

Die Bedeutung, die aromatische Kräuter in der Geschichte der Menschheit gespielt haben, kann kaum überschätzt werden. In frühzeitlichen Hochkulturen hatten aromatische Kräuter oft eine sakrale Bedeutung. Als Rauchopfer wurden sie den Göttern dargebracht. Der aufsteigende aromatische Rauch stellte eine (wohlwollende) Verbindung zur jenseitigen Welt der Götter, Geister oder Ahnen her. Man war überzeugt, dass der kräftige Geruch böse Geister und Dämonen (im Diesseits) vertreibt. Aus dem gleichen Grunde hielt man sie auch für heilkräftig, denn böse Geister und Dämonen galten in vielen Kulturen als Urheber von Krankheit und Siechtum. Aber schon damals spielten neben dem Sakralen und dem Gesundheitlichen auch hedonistische und ästhetische Aspekte eine wichtige Rolle. Die Ägypter verarbeiteten aromatische Pflanzen zu Parfum und Kosmetika und sie balsamierten ihre mumifizierten Toten damit ein. Die alten Römer streuten Thymian zwischen die Getreidevorräte, um sie vor Fäulnis zu schützen. Am häufigsten aber wurde Thymian damals wie heute als Gewürz verwendet. Die Römer wollten auch in den eroberten Gebieten nördlich der Alpen nicht auf den Thymian verzichten, wie archäologische Ausgrabungen belegen. Doch mit den Römern verschwand auch der Thymian wieder von der Bildfläche nördlich der Alpen. In England kann er ab dem 11. Jh. wieder nachgewiesen werden. In Deutschland und der Schweiz erst ab dem 16. Jahrhundert. Die Germanen mussten aber nicht gänzlich auf Thymian verzichten. Die Nutzung des heimischen Quendel (*Thymus serpyllum*), einem winterharten nahen Verwandten des Thymians, hat nördlich der Alpen eine lange Tradition, wie archäologische Funde belegen.

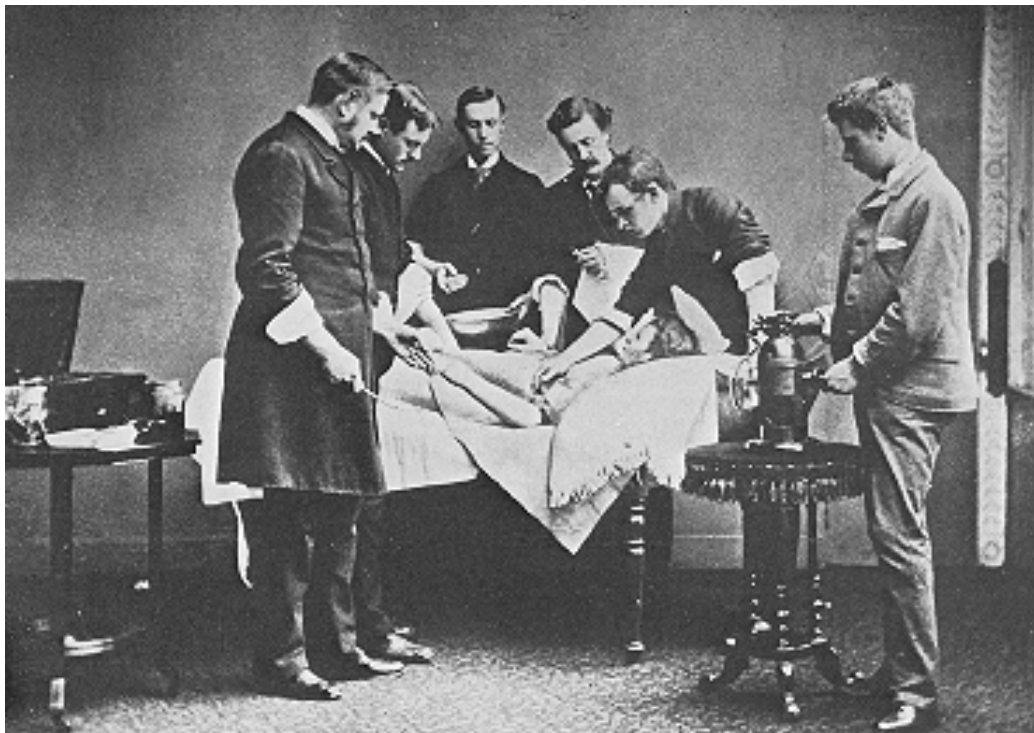
Obwohl das Prinzip der Destillation schon vor über 5000 Jahren bekannt gewesen sein muss, wie eine primitive Destillationsapparatur aus Terrakotta bezeugt, die im heutigen Pakistan gefunden wurde und die auf 3000 v. Chr. datiert wurde, entwickelte sich die Destillationstechnik aus verschiedenen Gründen nur sehr langsam (ungenauere Temperaturmessung von Hand, Schwierigkeiten bei der Glas- und Keramikherstellung, u.a.m.). Die Griechen verwendeten die Destillation vor allem zur Herstellung von Russ, aus dem sie Tinte herstellten. Aber auch die Gewinnung von Süßwasser aus Salzwasser, mit Hilfe von natürlichen Schwämmen, die in den Dampf kochenden Salzwassers gehängt wurden, war bekannt. Zur Zeit der arabischen Hochkultur zwischen dem 6. und 12. Jahrhundert erlebt die Destillation ätherischer Öle eine erste Blütezeit. Rosenwasser, das bei den Arabern heute noch hoch im Kurs steht, wurde damals im grossen Stil destilliert und sogar bis nach China exportiert. Die erste schriftliche Vorschrift zur Darstellung von Alkohol aus Wein stammt aus der Feder von Adelard von Bath (Salerno 1130), der an der Schule von Salerno, dem ersten laikalen Zentrum für Medizin, tätig war. Während den Pestzügen des 14. Jh. breitete sich das Destillieren insbesondere von Dünnbier stark aus. Im „aqua vitae“ glaubte man eine wirksame Medizin gegen die Pest gefunden zu

haben. Man trank die gebrannten Wasser aber nicht nur als Arznei, sondern auch als Genussmittel (gemütsaufhellend, schmerzstillend).

1512 erscheint das grosse Destillierbuch von Hieronymus Brunschwyg [13], ein umfassendes Kompendium für Ärzte und Apotheker. Damals wurde beinahe alles destilliert (Tiere, Blut, Urin, ...), denn das alchemistisch motivierte Ziel bestand darin, einen rein geistigen Wirkstoff zu schaffen, der von allen Ballaststoffen befreit war; der „quinta essentia“. Relikte dieser Vorstellung findet man heute noch bei spagyrischen Verfahren, die massgeblich von Paracelsus geprägt wurden. Das Zeitalter der Entdeckungen bescherte Europa ganz neuartige aromatische Genüsse. Gewürze wie Nelke, Muskat und Pfeffer, standen beim europäischen Adel hoch im Kurs. Die Gewinnspanne war so hoch, dass man die Vorherrschaft um den lukrativen Handel in erbitterten Kämpfen mit kriegerischen Mitteln ausfocht [14]. Die neuen Gewürze stellten damals eine hedonistische und finanzielle Bereicherung einer dünnen Oberschicht und des aufkommenden Bürgertums dar. Die Stellung des Thymians in Küche und Arzneischrank wurde durch diese exotischen Gewürze jedoch nicht bedroht. Der Quendel (*Thymus serpyllum*) war damals ein wichtiges "Frauenkraut", worauf sowohl die Indikationen als auch die Namensgebungen hinweisen: etwa Marikenbettstroh oder Marienbettstroh im deutschen Sprachraum (Marzell, 2002) [15]. An oberster Stelle der Indikationen standen oftmals Menstruationsbeschwerden sowie Husten und Leibschmerzen. Der Quendel wurde aber auch gegen Gifte eingesetzt, zur Stärkung des Magens, als Riechmittel für das Hirn und als gebranntes Wasser mit Rosenessig bei Kopfschmerzen (Hieronymus Bock, 1546 [16]). Im 17. Jh. taten sich besonders die Klöster in der Brennkunst hervor und machten gute Geschäfte damit. Aus dieser Zeit stammen die heute noch erhältlichen Kräuterliköre bzw. Kräuterschnäpse wie der Chartreuse oder das Karmeliterwasser. In der ersten Hälfte des 19. Jh. war das Verfahren der Wasserdampfdestillation dann endlich so weit entwickelt, dass es grosstechnisch genutzt werden konnte. Ätherische Öle waren aber nach wie vor eine Domäne der Parfümöre. Die Antipoden der Duftpalette bildeten damals die ausserordentlich dauerhaften schweren animalischen Düfte (Amber, Moschus, Zibet) und die frischen pflanzlichen Frühlingsdüfte. Rose und Lavendel dominierten die Pflanzendüfte aber auch Veilchen, Rosmarin und Thymian waren häufig Bestandteil von Parfüm. Erst mit René Maurice Gattefossé, der 1928 den Begriff "Aromatherapie" prägte, traten ätherische Öle als potentielle Arzneimittel in Erscheinung. Gattefossé, ein Chemiker und Parfümöre, der sich im eigenen Parfümbetrieb eine Verbrennung am Unterarm zugezogen hatte, behandelte seine Brandwunde mit Lavendelöl und war von der unerwartet schnellen und guten Heilung überrascht. Seither widmete er sich den pharmakologischen Eigenschaften der ätherischen Öle und publizierte darüber.

Bis Mitte des 19. Jh. starb die Hälfte aller operierten Patienten an postoperativen Infektionen. Joseph Lister (1827 – 1912) setzte 1867 erstmals Karbolsäure

(Phenol) zur Wundreinigung ein. Eine Konzentration von 0,2 – 1% wirkte bakterizid. Während Operationen wurden Phenolzerstäuber eingesetzt, mit denen die Luft desinfiziert werden sollte (Abb. 1). Thymol als phenolische Verbindung stand damals nicht zur Verfügung. Es wäre noch effizienter und gleichzeitig weniger toxisch gewesen. Durch den Einsatz von Karbolsäure gelang es die Infektionshäufigkeit drastisch zu reduzieren. Das Einatmen der Karbolsäuredämpfe war für die Ärzte und Schwestern jedoch nicht ungefährlich. Allergien, Hautverätzungen und sogar Nieren und Lebeschäden häuften sich. Es zeigte sich auch, dass die Bakteriendichte in der Luft überschätzt wurde, weshalb das Karbolzerstäuberverfahren schliesslich wieder aufgegeben wurde.



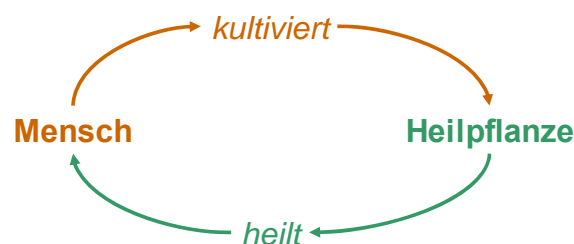
**Abb. 1:** Der von Lister 1865 erfundenen Karbolzerstäuber im Einsatz. Seine Anwendung reduzierte die Infektionshäufigkeit bei Operationen deutlich.

Paul Ehrlich entdeckte 1910 Arsphenamin, das gegen Spirochäten (Syphilis) wirkt. Im gleichen Jahr als Gattefossé den Begriff Aromatherapie prägte (1928), entdeckte Alexander Fleming das Penicillin. Es dauerte allerdings noch 16 Jahre bis Penicillin 1944 den Alliierten als wirksames Antibiotikum zur Verfügung stand. Das erste deutsche Penicillin-Präparat, das 1946 auf den Markt kam, war ein Wundpuder. Es setzte weltweite intensive Forschungstätigkeit ein. Der Erfolg der Antibiotika war überwältigend. Die Infektionskrankheiten, die während Jahrhunderten bzw. Jahrtausenden die häufigste Todesursache darstellten, verloren ihren Schrecken. Heute stehen zumindest in den industrialisierten Ländern zu oberst auf der Rangliste der häufigsten Todesursachen Herz- und Kreislauferkrankungen.

Die rasante Resistenzentwicklung vieler Krankheitserreger schränkt heute die Therapiemöglichkeit mit Antibiotika zunehmend ein. Das Auftreten von Resistenzen ist jedoch kein neues Phänomen. Schon kurz nach Einführung der

ersten Antibiotika (Penicillin) traten die ersten Resistenzen auf. Bereits in den frühen 50er Jahren des 20. Jahrhunderts erwachte aus diesem Grund das Interesse an Kombinationen antimikrobiell wirksamer Stoffe mit synergistischen Wirkungen und dieses Interesse ist heute grösser denn je [17]. Denn in den letzten Jahrzehnten sind trotz intensiver Forschung nur wenige neue Antibiotika auf den Markt gekommen. Ätherische Öle haben nicht das Potenzial die klassischen Antibiotika zu ersetzen, denn die für eine systemische Wirkung erforderlichen Konzentrationen wären so hoch, dass bereits toxische Nebenwirkungen auftreten würden. Für äusserliche Anwendungen aber (Salben, Gurgeln, Inhalieren), kann Thymianöl eine wirksame Prophylaxe gegen Infektionen (Wunden, Keuchhusten, Bronchitis) darstellen und eine sinnvolle Ergänzung zur schulmedizinischen Versorgung von Wunden, Keuchhusten und Bronchitis sein.

Lange Zeit wurden die ätherischen Öle als nutzlose Abfallprodukte des Primärstoffwechsels angesehen. Heutzutage besteht gerade die gegenteilige Tendenz. Hinter jedem Sekundärstoff wird heutzutage eine ökologische Bedeutung hervorgezaubert, und jeder Hinweis darauf mit Darwins Selektionstheorie zu untermauern versucht. Selektion führt aber nicht zwangsläufig zu Vielfalt (der Arten) oder Stabilität (der Ökosysteme), sondern fast ausnahmslos zu einem Artenverlust (Flaschenhals) und zu Instabilität. Lässt der Selektionsdruck nach, nimmt die Artenvielfalt in der Regel wieder zu. Der weitaus grösste Teil der Sekundärstoffe ist zweifellos Selektionsneutral und bringt der Pflanze weder essentielle Vor- noch Nachteile. Ein deutlicher Hinweis darauf sind die vielen unterschiedlichen Chemotypen von *Thymus zygis*, die nebeneinander in den unterschiedlichsten Habitaten koexistieren. Selbst wenn die Chemotypen wie bei *Thymus vulgaris* vererbbar und standortgebunden sind (Chemotypen = Rassen), müsste erst noch gezeigt werden, dass die ätherischen Öle einen selektiven Vorteil für die Besiedlung des entsprechenden Habitats darstellen. Dennoch lassen sich viele Beispiele finden, bei denen Sekundärstoffe für die Pflanze von Vorteil sind oder bei denen Sekundärstoffe sozusagen das Agens einer symbiotischen oder mutualistischen Beziehung darstellen. Im weitesten Sinne kann auch die Interaktion Mensch-Arzneipflanze als eine mutualistische Beziehung verstanden werden; denn für beide Seiten, für die Arzneipflanze wie für den Menschen ist die Beziehung von Nutzen.



**Abb. 2:** Mutualismus zwischen Mensch und Heilpflanze.

## 5 Charakterisierung von Vielstoffgemischen

Unser Alltag wird von Vielstoffgemischen dominiert. Praktisch alles was uns umgibt (Holz, Gestein, Metalle, Pflanzen und Tiere) und was wir zu uns nehmen (Luft, Wasser, Nahrungsmittel), sind Vielstoffgemische. Monosubstanzen trifft man in der Natur, zumindest in grösseren Mengen, nur selten an (Gold, Diamanten). Wenn Vielstoffgemische trotzdem stiefmütterlich behandelt werden, dann nicht weil es an praktischer Relevanz fehlt, sondern weil der experimentelle und der theoretische Zugang wesentlich schwieriger ist als bei Monosubstanzen.

Mit der Darstellung reinen Morphins durch den deutschen Apotheker Sertürner (1806) beginnt im 19. Jh. der Siegeszug der reinen Monosubstanzen. Insbesondere der Einsatz stark wirksamer Substanzen mit geringer therapeutischer Breite wird nun sicherer, da man in der Lage ist genau zu dosieren. Doch die Idee, dass reine Stoffe den Vielstoffgemischen a priori überlegen seien, bewahrheitete sich nicht. Professor Loewe, ein Pionier auf dem Forschungsgebiet der Arzneikombinationen, schrieb 1927: «Die Arzneigemische sind heute zu der Würdigung gelangt, die ihnen zukommt: Es wird nicht mehr bestritten, dass ein Medikament, das aus zwei oder mehreren Einzelpharmaka zusammengesetzt ist, die Bedeutung eines neuen pharmakologischen Individuums besitzen kann.» [18] Kombinationspräparate sind heute aus der modernen Schulmedizin nicht mehr wegzudenken. AIDS wäre ohne Arzneimittelskombinationen praktisch nicht behandelbar, ebenso die Tuberkulose. Moderne Anästhesieverfahren nutzen die vorteilhaften Wechselwirkungen unterschiedlicher Anästhetika [19-20]. Antimikrobiell wirksame Kombinationen werden wegen des breiten Wirtsspektrums, das sie besitzen, häufig bei schwer erkrankten Patienten gegen Sepsis eingesetzt, oder bei Infektionen mit resistenten Keimen. Phytopharmaka stellen als Vielstoffgemische jedoch nach wie vor eine Besonderheit dar. Es sind nicht nur die vielen Inhaltsstoffe, die auch heute noch teilweise unbekannt sind, sondern auch die Wechselwirkungen der bereits bekannten Stoffe sind noch wenig erforscht. So gibt es Phytopharmaka von denen man zwar die Wirkstoffe mit ihren pharmakologischen Wirkungen kennt, diese aber die klinisch beobachtete Wirkung nicht vollständig zu erklären vermögen. Oder man stellt fest, dass die Wirkstoffe als Monosubstanzen nicht so gut wirken wie der Gesamtextrakt, obwohl man im Gesamtextrakt keine weiteren Wirkstoffe findet. MS-Patienten berichten fast durchwegs, dass ihnen die Droge Cannabis besser hilft als die Monosubstanz Tetrahydrocannabinol. Die Droge Ephedra soll weniger Nebenwirkungen verursachen als die Monosubstanz Ephedrin. Die Wirksamkeit von Hypericum, das mehrere aktive Substanzen enthält, verändert sich mit der Wahl des Extraktionsmittels und dem Herstellungsverfahren. Die Wirkung eines pflanzlichen Arzneimittels wird also von der Gesamtheit der Inhaltsstoffe sowie dem Herstellungsverfahren bestimmt. Deshalb ist für jedes

Herstellungsverfahren ein separater Nachweis der Wirksamkeit und Verträglichkeit von Seiten des Herstellers zu erbringen. Verhältnismässig gut untersucht sind Interaktionen von Xenobiotika mit Enzymen des Leberstoffwechsels, zu denen die Cyt-P450-Familie gehört und die MDR-Transporter, da viele unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf solchen Wechselwirkungen beruhen. Arzneistoffe können die Aktivität dieser Stoffwechselenzyme verändern und dadurch die Serumkonzentration eines anderen Wirkstoffes im Körper erhöhen oder verringern. Ein viel zitiertes Beispiel ist Hyperforin, das die Synthese von CYP3A4 induziert, wodurch andere Arzneimittel schneller abgebaut werden und dadurch zumindest ein Teil ihrer Wirkung verlieren. Solche indirekten Interaktionen über Enzyme sind wesentlich häufiger als direkte chemische Interaktionen zwischen Arzneistoffen.

## 5.1 Kombinationseffekte

Im Folgenden wird die Problematik rund um die Vielstoffgemische mit Hilfe einfacher Modelle und Graphiken beschrieben. Modelle sind wie Theorien, sie sind weder falsch noch richtig, sondern brauchbar oder unbrauchbar, und darüber entscheiden in der Regel die Praxis und die Zeit.

Als erstes gilt es, zwei grundsätzlich verschiedene Kombinationswirkungen auseinander zu halten: quantitative und qualitative Kombinationswirkungen. Das Auftreten völlig neuer Qualitäten bei neuartigen stofflichen Kombinationen ist in der Regel nicht vorhersagbar, und stellt deshalb für die Erfassung ein grosses Problem dar. Auch Arzneimittelnebenwirkungen können auf solchen unvorhersehbaren Kombinationswirkungen beruhen. Insbesondere synthetische oder naturanaloge Stoffe stellen für den menschlichen Stoffwechsel stets eine unbekannte Herausforderung dar, deren Folgen meistens nicht absehbar sind. Deshalb müssen Arzneimittel letztlich auch am Menschen getestet werden, bevor sie in den Handel kommen. Manchmal manifestieren sich solche Nebenwirkungen erst in Gegenwart einer seltenen speziellen Konstitution, oder bei Einnahme eines anderen Arzneimittels, so dass diese Nebenwirkungen erst in der Postmarketing Phase auftreten. Als Arzneimittelnebenwirkungen sind solche Kombinationseffekte zwar gefürchtet, doch steckt in solchen Kombinationen auch das Potenzial neuer Heilkräfte. Durch automatisierte Screeningverfahren neuartiger Stoffkombinationen hofft man, in Zukunft nicht nur neue Arzneimittel zu finden, sondern weitere Verbindungen im Netzwerk des Stoffwechsels aufdecken zu können [1]. Das Aufdecken neuer qualitativer Eigenschaften war jedoch nicht das Ziel dieser Arbeit. In der vorliegenden Arbeit wurden quantitative Aspekte der antimikrobiellen Wirkung unterschiedlicher Kombinationen von Vielstoffgemischen und Monosubstanzen ätherischer Öle untersucht und mittels MHK und der Kill-Rate miteinander verglichen. Im Wesentlichen lassen sich drei Typen quantitativer

Kombinationswirkungen unterscheiden: additive, synergistische und antagonistische Kombinationswirkungen.

**Additive Wirkung:**

$$A + B = (A + B)$$

Summe der Einzelwirkungen.

Unbeeinflusstes Nebeneinander.

**Synergismus:**

$$A + B < (A + B)$$

Zusammenwirken von Substanzen, die sich gegenseitig fördern.

Die Gesamtwirkung ist grösser als die Summe der Einzelwirkungen.

Die Aktivität ist überadditiv oder potenziert.

**Antagonismus:**

$$A + B > (A + B)$$

Zusammenwirken von Substanzen, die sich gegenseitig hemmen.

Die Gesamtwirkung ist kleiner als die Summe der Einzelwirkungen.

Die Aktivität ist überadditiv oder potenziert gehemmt.

### 5.1.1 Definition und Begriffsvielfalt

Die Definition und Abgrenzung der drei Begriffe additiv, synergistisch und antagonistisch ist leider alles andere als einheitlich. Streng genommen bedeutet additiv keine Interaktion. Das entspricht der Situation des Kontrollansatzes, bei dem die beiden eingesetzten Stoffe identisch sind, oder die beiden Stoffe den gleichen Wirkmechanismus besitzen und die gleiche Affinität zu ihrem Target haben. Oft werden aber auch Kombinationswirkungen als überadditiv bezeichnet, die eigentlich nur einen additiven Effekt aufweisen. In biologischen Systemen sind Abweichungen von Erwartungswerten oder Sollwerten aber eher die Regel als die Ausnahme und für klinisch relevante Erhöhungen der Wirkung ist ein gewisses Ausmass an überadditiver Wirkung erforderlich. Deshalb kann nicht jede beliebige Abweichung von einer rein additiven Wirkung bereits als synergistisch bzw. antagonistisch bezeichnet werden. Im Bereich der pharmakologischen Fragestellungen haben sich in den letzten Jahrzehnten nach und nach Grenzwerte für Synergismus ( $FICI < 0.5$ ) und Antagonismus ( $FICI > 4$ ) herauskristallisiert [21]. Trotzdem herrscht eine verwirrende Begriffsvielfalt, die nicht zuletzt daher rührt, dass das Thema Kombinationswirkungen Gegenstand ganz unterschiedlicher wissenschaftlicher Disziplinen ist.



<b>Kombinationswirkungen</b>		
<b>Mehr als additiv</b>	<b>Additiv</b>	<b>Weniger als additiv</b>
Augmentation	Additive Synergism	Antagonism
Coalism	Additivity	Antergism
Enhancement	Additivism	Depotentialtion
Pos. Synergism	Independence	Desensitisation
Potentiation	Indifference	Infraadditivity
Sensitation	Non-Interaction	Negative Synergism
Superadditivity	Summation	No Addition
Synergism	Superposition	Non-Interaction
Synergy	Zero-Interaction	Subadditivity

**Tab. 1:** Gebräuchliche Begriffe zur Beschreibung von Kombinationswirkungen (verändert nach Kindorf 1995 [22]).

## 5.2 Klassifizierung von Kombinationseffekten

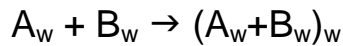
Die Stoffe, die an einem Kombinationseffekt beteiligt sind, müssen als Einzelstoffe nicht unbedingt eine Wirkung haben, zumindest nicht jene Wirkung, die die Kombination aufweist. Die folgende Klassifizierung beruht auf dem Vergleich der Wirkung der eingesetzten Monosubstanzen mit der Wirkung der Kombination:

- 1) Jeder Stoff der Kombination besitzt eigene Aktivität, mit gleicher oder ähnlicher Wirkung.
- 2) Nur einer der beiden Stoffe besitzt die gewünschte Aktivität und der andere Stoff moduliert diese Aktivität positiv oder negativ.
- 3) Keiner der beteiligten Kombinationspartner zeigt als Einzelstoff Aktivität, gemeinsam aber entwickeln sie Aktivität.  
Loewe bezeichnet diese Form der Interaktion als „eigentliche Mischwirkung“ und hebt damit den Unterschied zu den beiden vorhergehenden Kombinationswirkungen hervor, bei denen es sich ja nur um Variationen der Intensität handelt. Bei der koalitierten Wirkung treten dagegen Wirkungen auf, die in den Komponenten überhaupt nicht vorhanden sind [18].

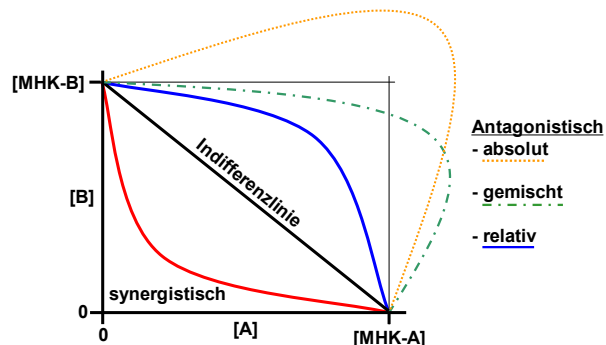
Die darauf beruhenden unterschiedlichen Effekte werden besonders deutlich, wenn sie in Form von Isobologrammen dargestellt werden (Abb. 3).

## Klassifizierung von Kombinationswirkungen

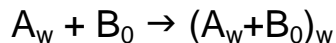
- 1) gemeinsame Wirkung  
(*congruous*)



A u. B = Wirkstoffe

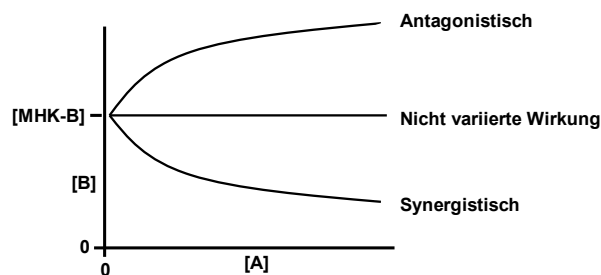


- 2) keine gemeinsame Wirkung (*syncretic*)

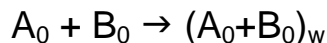


B = Wirkstoff

A = Modulator



- 3) nur gemeinsame Wirkung  
(*koalierte Wirkung*)



A u. B = pot. Wirkstoffe

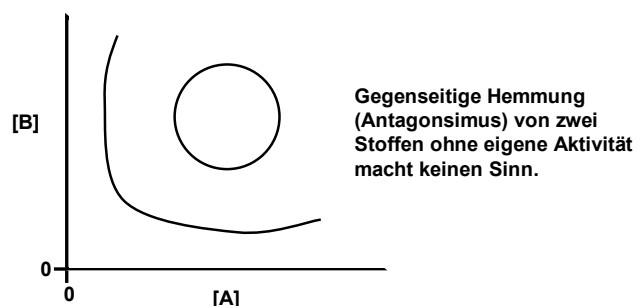




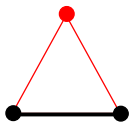
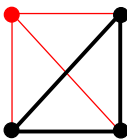
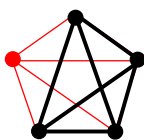
Abb. 3: Klassifizierung von Kombinationswirkungen nach Loewe & Muischnek (1926) [23].

## 5.3 Quantitative Aspekte stofflicher Interaktionen

### 5.3.1 Berechnung der maximalen Anzahl Interaktionen

Mit der Zugabe eines neuen Stoffes zu einem Gemisch, das bereits aus  $n$  Stoffen besteht, können maximal  $n$  neue Interaktionen auftreten. Die Gesamtzahl der möglichen Interaktionen eines Vielstoffgemisches kann, basierend auf diese Gesetzmässigkeit, als Summe aller Interaktionen berechnet werden, die bei schrittweiser Zugabe von Stoff 1 bis Stoff  $n$  hinzukommen. Dieser Zusammenhang lässt sich mit Hilfe regelmässiger Vielecke sehr einfach graphisch darstellen (Abb. 4). Die Stoffe werden als Knoten, die Interaktionen

als Verbindungslinien zwischen den Knoten dargestellt. Zum gleichen Ziel führen kombinatorische Überlegungen: Die Anzahl möglicher Interaktionen entspricht der Anzahl Kombinationsmöglichkeiten, die aus einer Menge von  $n$  Elementen mit 2 Elementen ohne Berücksichtigung der Reihenfolge und ohne Wiederholung möglich sind.

Maximale Anzahl möglicher Interaktionen						
Elemente (n):	1	2	3	4	5	...
Darstellung:						...
Interaktionen:	0	1	3	6	10	...

---

Berechnung:	$\sum_{k=1}^n (k-1)$	=	$\frac{n \cdot (n-1)}{2}$	=	$\binom{n}{2}$
	graphisch		explizit		kombinatorisch

**Abb. 4:** Berechnung der Anzahl maximal möglicher Interaktionen in homogenen Medien.

### 5.3.2 Die Bedeutung der Teile für das Ganze

Aus dem pointierten Satz: «Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile», der die Bedeutung des Synergismus in gewissem Sinne auf den Punkt bringt, könnte man leicht eine Geringschätzung gegenüber den Teilen heraushören. Paradoxerweise spielen aber bestimmte Teile gerade bei synergistisch wirkenden Kombinationen eine besonders wichtige Rolle. Dies wird deutlich, wenn einer der Stoffe, der am Synergismus beteiligt ist, aus einer solchen Kombination entfernt wird. Je nach Ausmass des Synergismus bleibt zwar noch eine gewisse Aktivität erhalten, doch ein überproportional grosser Anteil der Aktivität geht mit dem entfernten Stoff verloren. Ein weitere Aspekt mit paradoxem Charakter ist folgender: Wird einem Vielstoffgemisch, bestehend aus 100 Komponenten, eine einzige Substanz hinzugefügt oder entfernt, so scheint die Bedeutung dieser einen neuen bzw. fehlenden Komponente vernachlässigbar klein zu sein, solange ihr Anteil nicht überproportional gross ist. Berücksichtigt man jedoch die Anzahl potentiell neuer bzw. eliminierter Interaktionen, nämlich 100 bzw. 99 Interaktionen, dann lässt sich die Bedeutung dieser einen Substanz nicht mehr so einfach von der Hand weisen. Im Gegenteil: mit jedem Stoff, den man hinzufügt, nimmt der Beitrag an potentiellen Interaktionen theoretisch zu. Praktisch ist es jedoch so, dass in einem

pflanzlichen Vielstoffgemisch hinsichtlich einer bestimmten Wirkung nicht alle Inhaltsstoffe die gleiche Bedeutung haben und es interagieren bei weitem nicht alle Stoffe miteinander, zumindest nicht so, dass die Interaktionen die Wirkung dramatisch beeinflussen. In Bezug auf die (erwünschte) Wirkung lassen sich grundsätzlich drei Stoffgruppen unterscheiden: Wirkstoffe, bioaktive Stoffe und Ballaststoffe. Letztere können weiter unterteilt werden in inerte und toxische Stoffe. An der spezifischen Wirkung sind also in erster Linie die Wirkstoffe beteiligt, die durch bioaktive Stoffe moduliert werden können. Inerte Stoffe beeinflussen die Wirkung nicht, toxische Stoffe dagegen sind mit oder ohne Beeinflussung der Wirksamkeit grundsätzlich unerwünscht. Das Beispiel des Thymianöls zeigt aber, dass ein Stoff in mehreren Gruppen auftauchen kann. Carvacrol und Thymol haben nicht nur antimikrobielle Aktivität, sie besitzen ebenfalls ein hohes antioxidatives Potential, und können in sehr hohen Konzentrationen sogar toxisch wirken. Toxische Wirkungen treten aber erst bei sehr hohen Konzentrationen auf, die bei sachgerechter Anwendung nicht erreicht werden. Bei physiologisch gut verträglichen Konzentrationen, wie sie in Salben und Tinkturen vorkommen, dürfte insbesondere das antioxidative Potential von Bedeutung sein, das eine stabilisierende (konservierende) Wirkung hat, sich allerdings nicht oder nur unbedeutend auf die antimikrobielle Aktivität auswirkt.

<b>Wirkstoffe im engeren Sinn</b>	<b>Bioaktive Substanzen</b>	<b>Ballaststoffe</b>
<i>Hauptwirkung</i>	<i>Erwünschte Nebenwirkungen</i>	<i>Keine &amp; unerwünschte Nebenwirkungen</i>
<b>Carvacrol</b> (am) <b>Thymol</b> (am) Linalool (am) Borneol (am) Geraniol (am) ...	<b>Carvacrol</b> (ao) <b>Thymol</b> (ao) p-Cymen (ao & pe) ...	<b><u>keine Wirkung</u></b> - $\gamma$ -Terpinen - ...  <b><u>toxische Wirkung</u></b> - Carvacrol (nt) - Thymol (nt)

**Tab. 2:** Inhaltsstoffe können unterschiedliche Funktionen und Bedeutungen haben. Mit zunehmender Konzentration können sich die physiologischen Wirkungen der Stoffe verändern (am = antimikrobiell; ao = antioxidativ; pe = penetration enhancer; nt = neurotoxisch in hohen Konzentrationen).

In nicht kompartimentierten flüssigen oder gasförmigen Medien bzw. Räumen, wie sie Pflanzenextrakte, Tinkturen, Salben und Cremes oder durch Wasserdampfdestillation gewonnene ätherische Öle darstellen, sind die Inhaltsstoffe in der Regel homogen verteilt, so dass grundsätzlich jeder der n

Inhaltsstoffe mit allen anderen  $n-1$  Inhaltsstoffen in Wechselwirkung treten kann. Aus sterischen Gründen können lokal auch in homogenen Mischungen immer nur eine beschränkte Anzahl Interaktionen gleichzeitig stattfinden. Der grösste Teil all dieser theoretisch möglichen Interaktionen dürfte ohne nennenswerte additive oder subtraktive bzw. synergistische oder antagonistische Wirkung sein. Dennoch können sich viele an und für sich unbedeutende Interaktionen zu einer synergistischen Wirkung addieren oder gar potenzieren.

### **5.3.3 Vielstoffgemische im Experiment**

Um das Zusammenspiel der verschiedenen Inhaltsstoffe eines komplexen Vielstoffgemisches aufzudecken, müssen die Inhaltsstoffe einzeln sowie in Kombinationen unterschiedlicher Zusammensetzungen untersucht werden. Eine Aufgabe die schon bei wenigen Inhaltsstoffen mit einem enormen Aufwand verbunden sein kann. Insbesondere dann, wenn keiner der Einzelstoffe für sich eine Wirkung besitzt (koalierte Wirkung). Für eine erschöpfende Untersuchung von  $n$  Inhaltsstoffen wären theoretisch  $2^n$  Experimente erforderlich (0-Kontrolle und Einzelstoffe mit eingeschlossen). Bei fünf Inhaltsstoffen wären 32 Experimente erforderlich, bei 10 Inhaltsstoffen bereits 1024 Experimente, dabei sind unterschiedliche Mischungsverhältnisse und Verdünnungsreihen noch nicht mitgezählt (siehe: Anhang 12.2.4). Arzneipflanzenextrakte bestehen aber in der Regel aus dutzenden bis hunderten von Inhaltsstoffen. Selbst wenn man viele der nur in Spuren vorhandenen Inhaltsstoffe zum vornherein als irrelevante Begleitstoffe ausschliesst, bleibt ein Fülle von potentiellen Wirkstoffen übrig. Es ist deshalb nicht erstaunlich, dass die Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen vieler Arzneimittel pflanzlichen Ursprungs nicht oder nur in Ansätzen bekannt sind, und man bis heute nur spärliche Kenntnisse der Interaktionsmechanismen besitzt. Ein verkürztes Verfahren für Kombinationen, die aus mehr als zwei Komponenten bestehen, welches besonders für die klinische Praxis bedeutsam ist, hat Berenbaum 1978 [24] vorgeschlagen. Nachdem die Effektdosen der Einzelstoffe  $[MHK]_i$  bestimmt wurden, wird von einem einzigen Mischungsverhältnis ( $\sum_{i=1}^n [MHK]_i / n$ ) der  $n$  Wirkstoffe eine Verdünnungsreihe angesetzt und der FICI dieser Mischung bestimmt. Der Anteil der Komponenten in dieser Mischung ist proportional zur Effektkonzentration der Komponenten. Für Kombinationen deren Wirkung sich mit dem Mischungsverhältnis stark verändert oder gar ins Gegenteil umschlägt, ist dieses verkürzte Verfahren nicht oder nur bedingt brauchbar (siehe Anhang: 12.2.5).

### **5.3.4 Die koalierte Wirkung – der Problemfall**

Ein besonderes Problem bei der Identifikation der Wirkstoffe bzw. der Wirkstoffkombination stellen Stoffgemische mit koalierter Wirkung dar. Ihre Wirkung beruht ausschliesslich auf Wechselwirkungen zweier oder mehrer

Inhaltsstoffe. Wie aufwändig die Identifikation der beteiligten Stoffe sein kann, soll ein fiktives Rechenbeispiel verdeutlichen. Es sei ein "Vielstoffgemisch" bestehend aus 10 Inhaltsstoffen (ABCDEFGHIK) gegeben, dessen Aktivität/Wirkung auf dem Zusammenspiel von genau drei bestimmten Inhaltsstoffen (ABC) beruhe. Man hat also festgestellt, dass der Gesamtextrakt aktiv ist und möchte nun die Wirkstoffe identifizieren. Die Analytik zeigt, dass der Gesamtextrakt aus nur 10 Stoffen besteht. Glücklicherweise sind alle zehn Inhaltsstoffe als Monosubstanzen in reiner Form verfügbar und werden nun als Einzelstoffe auf ihre Aktivität untersucht. Das Ergebnis ist enttäuschend: keine der zehn Monosubstanzen zeigt Aktivität. Weitere 45 Experimente mit zweier Kombinationen verlaufen ebenfalls erfolglos. Erst nach mindestens einem weiteren Experiment mit einer dreier Kombination wird man fündig. Es wären also mindestens 57 und höchstens 176 Experimente notwendig, um auf diese Weise die drei an der Wirkung beteiligten Stoffe ausfindig zu machen (Abb. 5). Obwohl heutzutage High-Troughput Screening Verfahren zur Verfügung stehen, lässt sich anhand dieses Beispiels zumindest erahnen, mit welchem Aufwand die Suche nach wirksamen Kombinationen verbunden ist.

<b>Identifikation der Wirkstoffe</b> einer Kombination mit koalierter Wirkung. Von insgesamt 10 Inhaltsstoffen seien <u>genau</u> 3 Inhaltsstoffe (ABC) für die Wirkung erforderlich.			
<b>Experimente</b>		<b>Ergebnisse</b>	
1. Gesamtextrakt:	$\begin{pmatrix} 10 \\ 10 \end{pmatrix} = 1$	✓	→ <b>ABCDEFGHIK</b>
2. Einzelstoffe:	$\begin{pmatrix} 10 \\ 1 \end{pmatrix} = 10$	0	
3. 2er Kombinationen:	$\begin{pmatrix} 10 \\ 2 \end{pmatrix} = 45$	0	
4. 3er Kombinationen:	$\begin{pmatrix} 10 \\ 3 \end{pmatrix} = 120$	✓	→ <b>ABC</b> (1 – 120)
Anzahl Experimente:		<b>= 57 bis 176</b>	

**Abb. 5:** Anzahl erforderlicher Experimente zur Identifikation der Wirkstoffe einer Kombination aus 10 Inhaltsstoffen mit koalierter Wirkung, die auf drei Inhaltsstoffen beruht. Mischungsverhältnisse und Verdünnungsreihen sind dabei noch nicht berücksichtigt.

Mittlerweile wurden in nahezu jeder Arzneipflanze Stoffe gefunden, die eine bestimmte (physiologische) Wirkung aufweisen. Oft lässt sich die klinische Wirkung des Vielstoffgemisches damit aber nicht restlos erklären. Solche Vielstoffgemische gehören zumindest im weitesten Sinne zu den Wirkstoffkombinationen mit koalierter Wirkung. Beispiele solcher Arzneipflanzen sind: *Calendula officinalis*, *Vitex agnus castus*, *Passiflora* u.a.m.

## 5.4 Qualitative Aspekte der Interaktionsmechanismen

Obwohl die hier verwendeten Methoden keine direkten Rückschlüsse auf die Interaktionsmechanismen erlauben, soll an dieser Stelle kurz auf die Vielfalt der möglichen Interaktionen eingegangen werden. In Anlehnung an die Unterteilung der pharmakologischen Wirkungsebenen, wie sie bei höheren Lebewesen vorgenommen wird, soll hier eine analoge Unterteilung für die Mikroorganismen vorgenommen werden. Interaktionen können die Wirkung grundsätzlich auf allen Ebenen beeinflussen.

### 1) Pharmazeutische Wechselwirkungen:

Chemisch-physikalische Wechselwirkungen zwischen den Stoffen:

- Es können neue Stoffe mit neuen Eigenschaften entstehen.
- gegenseitige Beeinflussung der Löslichkeit

### 2) Pharmakokinetische Wechselwirkungen:

Ein Stoff verändert die Resorption, Penetration, Metabolisierung oder Ausscheidung eines Wirkstoffes.

### 3) Pharmakodynamische Wechselwirkungen:

Ein Stoff verändert die Interaktion eines Wirkstoffes am eigentlichen Angriffspunkt (Proteinen, Enzymen, Nukleinsäuren, Membranen, etc.)

Thymianöl setzt sich fast ausschliesslich aus Monoterpenen zusammen. Es ist also ein relativ homogenes Vielstoffgemisch. Die verschiedenen Monoterpene können dennoch recht unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Chemisch-physikalische Interaktionen zwischen den Inhaltsstoffen können bereits bei der Herstellung des ätherischen Öls auftreten. Die chemische Zersetzung ätherischer Öle unter dem Einfluss von Licht und Sauerstoff führt langfristig meistens zur Verharzung des Öls und zum Verlust der antimikrobiellen Aktivität. Die eigentlichen Wirkstoffe interagieren in der Regel direkt mit Zellbestandteilen (Membranen, Rezeptoren, Enzymen, Nukleinsäuren) und lösen dadurch die pharmakologischen Effekte aus. Bioaktive Inhaltsstoffe können mit den Wirkstoffen interagieren und sie beispielsweise vor Oxidation schützen, ihre Löslichkeit erhöhen oder als penetration enhancer das Ein- und Durchdringen der Cytoplasmamembran erleichtern. Inerte Stoffe reagieren definitionsgemäss nicht. Sie verdünnen im Prinzip die Wirkstoffe und vergrössern das Volumen, was sich nicht selten sogar positiv auf die Handhabung der Stoffe auswirkt.

## 5.5 Nutzen und Risiken stofflicher Wechselwirkungen

Sowohl der grösste Nutzen als auch das grösste Risiko von Vielstoffgemischen beruht auf synergistischen bzw. antagonistischen Wechselwirkungen. Synergismus kann jedoch nicht a priori mit positiven und Antagonismus mit negativen Effekten gleichgesetzt werden. Ob die Auswirkungen synergistischer bzw. antagonistischer Wechselwirkungen positiv oder negativ sind, hängt von der jeweiligen konkreten Situation ab. Der klinisch bedeutendste Vorteil, den Vielstoffgemische gegenüber Einzelstoffen aufweisen können, ist ein überadditiver (synergistischer) Effekt, der sich sowohl in einer Zunahme der relativen Wirksamkeit (Efficacy) und/oder in einer Zunahme der relativen Potenz (Potency) oder aber in ganz neuen Qualitäten äussern kann. Da sich im vorliegenden Beispiel die bakterizide Wirkung nicht steigern lässt (100%iges Absterben) kann es sich bei dem allenfalls zu erwartenden synergistischen Effekt nur um eine Erhöhung der Potenz handeln. Heute gelten solche Wechselwirkungen erst dann als synergistisch, wenn sie ein gewisses Mass an überadditiver Wirkung aufweisen (Synergismus =  $FICI \leq 0.5$ ). Mit der überadditiven Wirkung sind die (potentiellen) Vorteile von Kombinationen jedoch nicht erschöpft. Weitere Vorteile sind ein grösseres Wirk- und Wirtsspektrum, das bei Mischinfektionen von Vorteil sein kann, eine verzögerte Resistenzentwicklung, wie dies bei Tuberkulose beispielsweise von Bedeutung ist, da die Behandlung in der Regel sehr lange dauert, und zu guter Letzt eine Verringerung toxischer Effekte, zu der schon die geringere Wirkstoffkonzentration der synergistisch wirkenden Kombination beitragen kann. Die toxischen Effekte können aber unter günstigen Umständen noch durch weitere qualitative Eigenschaften der Kombination verringert werden. Doch genau so gut wie die Wirksamkeit einer Kombination, verglichen mit den Einzelsubstanzen, zunehmen kann, kann sie auch abnehmen. Auch die Nebenwirkungen können zunehmen oder es können sogar ganz neue Nebenwirkungen auftreten. Aus Tabelle 3 wird ersichtlich, dass Wechselwirkungen sowohl ein Vorteil als auch ein Nachteil darstellen können. Ein breites Wirkspektrum birgt potentiell auch ein grösseres Risiko bezüglich unerwünschter Nebenwirkungen. Die geringere Toxizität eines Vielstoffgemisches äussert sich einem anderen Fall unter Umständen in einer erhöhten Toxizität. Und die gleichen Mechanismen, die zu einer verzögerten Resistenzentwicklung führen, können schliesslich auch die Selektion multipler Resistenzen fördern. Letztlich sind auch die quantitativen Effekte stofflicher Interaktionen nur beschränkt voraussagbar, denn qualitative und quantitative Effekte lassen sich zwar unter Umständen separat erfassen, sie liegen aber nie getrennt vor. Hinzu kommt, dass in-vitro Untersuchungen zu anderen Resultaten führen können als in-vivo Untersuchungen, da in den komplexen in-vivo Systemen viel mehr (unbekannte) Wechselwirkungen auftreten können als in den meistens auf das Wesentliche reduzierten in-vitro Systemen. Nutzen und Risiken stofflicher Interaktionen lassen sich zwar abschätzen, aber nicht exakt



vorhersagen. Sie müssen nach wie vor durch Experimente bzw. klinische Versuche bestimmt werden.

---

### Mögliche Vor- und Nachteile antibiotischer Kombinationen

---

#### **Vorteile:**

- Synergismus  
(Efficacy und/oder Potency)
- breites Wirkspektrum
- breites Wirtsspektrum
- verzögerte Resistenzentwicklung
- geringere Toxizität

#### **Nachteile:**

- Antagonismus  
(Efficacy und/oder Potency)
  - unerwünschte Nebenwirkungen
  - geringe Selektivität
  - Selektion multipler Resistenzen
  - höhere Toxizität
- 

**Tab. 3:** Jeder Kombinationseffekt hat grundsätzlich die Möglichkeit sich sowohl positiv als auch negativ auswirken zu können. Deshalb muss jede Kombination einer eigenen Prüfung unterzogen werden. Die Übersicht zeigt, dass Synergismus bzw. Antagonismus nicht a priori mit gut oder schlecht gleichgesetzt werden können.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Der Garten-Thymian (*Thymus vulgaris*)

#### Systematik:



**Familie:**  
Lamiaceae

**Gattung:**  
Thymus

**Art:**  
vulgaris

#### Deutsche Namen:

- Echter Thymian,
- Garten-Thymian,
- Gemeiner Thymian,
- Römischer Thymian
- Kuttelkraut

#### Englische Namen:

- Common Thyme
- Garden Thyme
- Rubbed Thyme
- Herb of Thyme

#### Französische Namen:

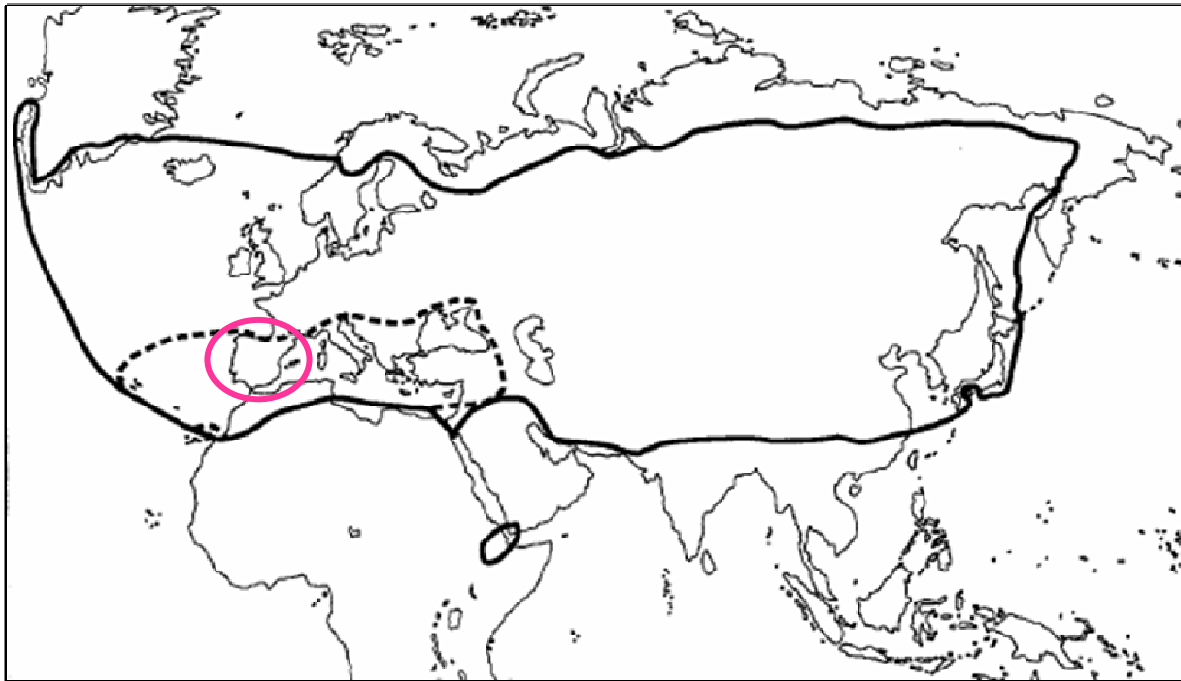
- Herbe de thym

**Abb. 6:** Abbildung von *Thymus vulgaris* aus Köhler's Medizinal-Pflanzen. [25]

Der Thymian ist ein immergrüner Zwergstrauch, mit zumindest am Grunde verholzten Zweigen, der etwa 15 – 40 cm hoch wächst. Die Blätter sind kurz gestielt, 5 – 10 mm lang, 2 – 3 mm breit und die Blattränder sind nach unten eingerollt. Die Blüten sind zwittrig oder weiblich (gynodiözisch). Sie stehen zu 3 – 6 in Blattachseln junger Triebe. Die Krone ragt deutlich über den Kelch hinaus, ist 2-lippig, blauviolett bis rosa, selten weiss. Die 4 Teilfrüchte (Klausen) enthalten vier Samen, die etwa 3 bis Jahre keimfähig bleiben. Die Samen sind Lichtkeimer. Blütezeit: Mai bis Oktober. Fruchtreife: Juli bis November. Der Thymian lässt sich ohne nennenswerte Aromaverluste trocknen.

### 6.1.1 Herkunft und Verbreitung

Das Herkunftsgebiet des gewöhnlichen Thymians ist die Mittelmeerregion, wobei die iberische Halbinsel die grösste Artenvielfalt beherbergt (Abb. 7). In unseren Breiten übersteht der gewöhnliche Thymian den Winter in der Regel nur an geschützten Lagen. Der Thymian ist auch in unserer Breiten leicht zu kultivieren und kann in einem Blumentopf auf dem Fenstersims oder in Feldkulturen im Freien gezogen werden (Abb. 10).

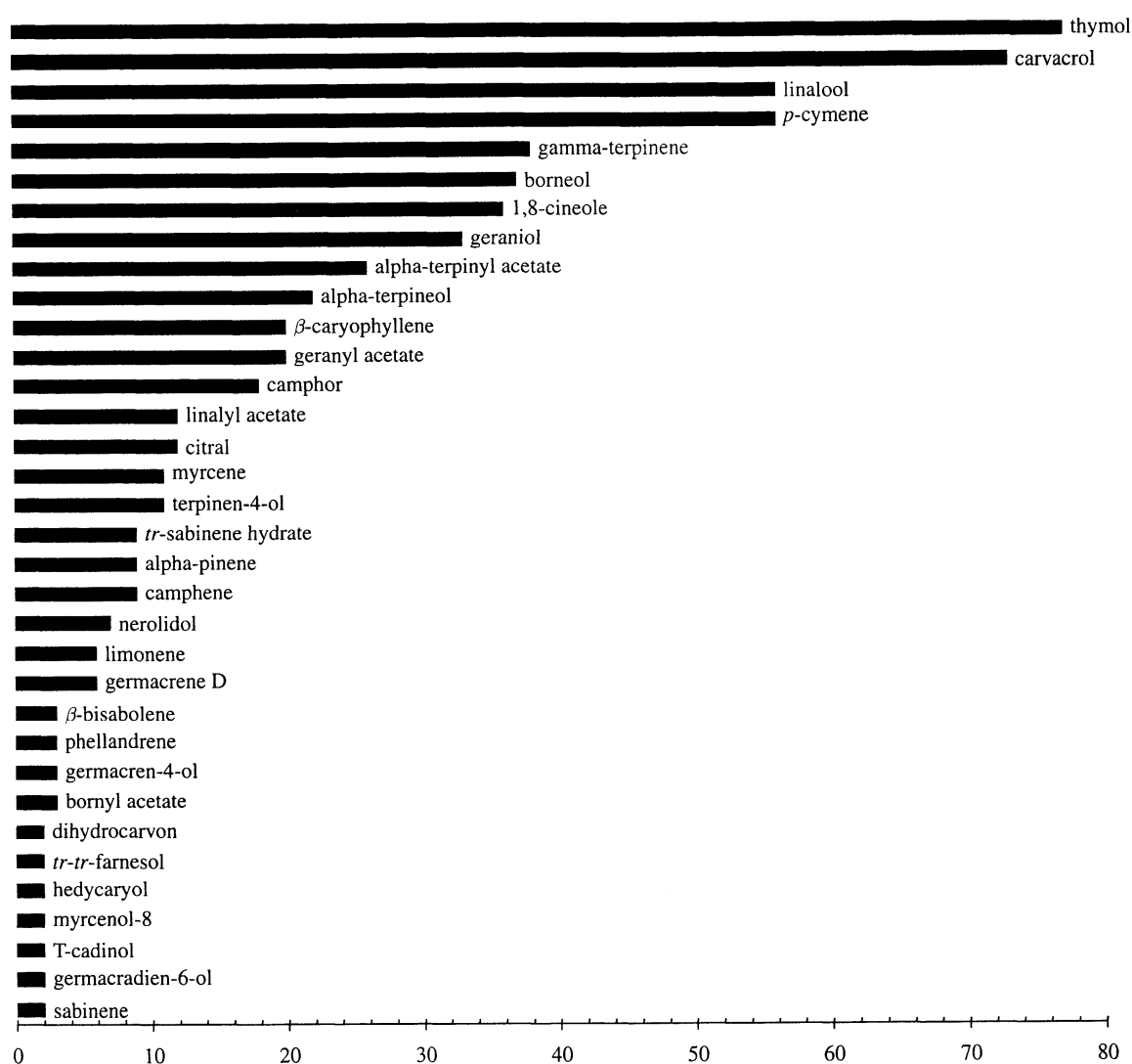


**Abb. 7:** Herkunft und Verbreitung der Gattung *Thymus*. Die grösste Artenvielfalt beherbergt die iberische Halbinsel (roter Kreis). Über die gestrichelte Linie hinaus erstrecken sich nur die Sektionen *Serpyllum* und *Hyphodromi* subsect. *Serpyllastrum* (Stahl-Biskup & Saez, 2002) [26].

### 6.1.2 Die Chemotypen und ihre Inhaltsstoffe

Die Thymianarten sind bekannt für ihre kräftigen Düfte. Insbesondere *Thymus vulgaris* und *Thymus zygis* werden als Gewürzpflanzen, als Duftlieferanten für Parfüm, Kosmetika und in der Nahrungsmittelindustrie eingesetzt oder als Arznei verwendet. Alle 162 Thymianarten, die bislang untersucht wurden, enthalten ätherisches Öl. Bisher wurden in den 162 untersuchten *Thymus*-Arten 360 unterschiedliche ätherische Öle gefunden. Es dominieren die Monoterpene mit einem Anteil von insgesamt ca. 43%, die Sesquiterpene sind mit 32% vertreten, nicht terpenoide Aliphate mit 17%, Benzen-Derivate mit 6% und Phenylpropane mit 2%. Der Anteil der Monoterpene beträgt meistens über 90%. Die häufigsten Inhaltsstoffe sind die beiden phenolischen Monoterpene Thymol und Carvacrol (Abb. 8). Innerhalb der Lamiaceen enthalten folgende Gattungen ebenfalls Thymol und/oder Carvacrol: *Coridothymus*, *Monarda*, *Origanum* und

*Satureja*. Ausserhalb der Familie der Lamiaceen konnte nur in der Apiaceae *Trachyspermum copticum* Thymol und Carvacrol gefunden werden. Etliche Thymian-Arten enthalten keine phenolischen Verbindungen (oder nur Spuren davon) weshalb die Thymus-Arten in phenolische und nicht phenolische Arten unterteilt werden. Mit einem Anteil von 55% überwiegen die phenolischen Arten. Weitaus weniger häufig aber praktisch allgegenwärtig sind die Sesquiterpene, deren häufigster Vertreter das  $\beta$ -Caryophyllen ist. Es ist bei keiner Art die Hauptkomponente, kann aber über 10% Anteil erreichen. Als nicht terpenoide aromatische Verbindungen sind die Phenylpropane Isoeugenol und Cimmamol zu nennen. Die intraspezifische Variation von *Thymus vulgaris* hinsichtlich der Inhaltsstoffe ist sehr gross. Nicht flüchtige Bestandteile des Krautes, die im Öl nicht oder nur in Spuren auftreten, sind Flavonoide (ca. 20, darunter Luteolin und Apigenin), Labiatengerbstoffe (Rosmarinsäure und Kaffeesäure) sowie freie Phenolcarbonsäuren.



**Abb. 8:** Häufigkeitsverteilung der Inhaltsstoffe der ätherischen Öle der Gattung *Thymus* (Quelle: Stahl-Biskup & Saez, 2002 [26]).

Von *Thymus vulgaris* existieren verschiedene Chemovarietäten. Die ätherischen Öle dieser Chemovarietäten unterscheiden sich einerseits durch die Namen gebende Hauptkomponente, andererseits aber auch durch eine unterschiedliche Zusammensetzung einer Vielzahl weiterer Komponenten. Die Zusammensetzung der unterschiedlichen Komponenten ist neben der genetischen Ausstattung auch von Boden, Klima, Wetter und Jahreszeit abhängig und somit relativ grossen Schwankungen unterworfen. Eine ausführliche Analytik der verwendeten Öle stellt deshalb eine wichtige Voraussetzung für die Interpretation der Ergebnisse dar.

Von *T. vulgaris* werden zur Zeit sechs Chemotypen unterschieden (Tab. 4). Die Chemotypen entsprechen nach Hegnauer (1978) [27] weitgehend der Definition für "Chemische Rassen": Die chemischen Eigenschaften werden vererbt und die Chemotypen treten in geographisch getrennten Arealen auf. Die phenolischen Chemotypen wachsen in heissen und trockenen Gebieten, der Linalool- und der alpha-Terpineol-Typ in feuchtem Klima und der Geraniol-Typ in feuchten und kalten Regionen. Die Thymianart *T. zygis*, die ebenfalls kommerziell (auch pharmazeutisch) genutzt wird, ist noch viel polymorpher und lässt sich nicht in Chemotypen unterteilen. Innerhalb der Art *T. zygis* wachsen chemisch unterschiedlich zusammengesetzte „Subspezies“ in unmittelbarer Nähe zueinander. Da es bei *T. zygis* keine Korrelationen zwischen der chemischen Zusammensetzung und klimatischen Regionen gibt, handelt es sich bei diesen Chemovarietäten nicht um chemische Rassen.

### **Chemotypen des Art *Thymus vulgaris***

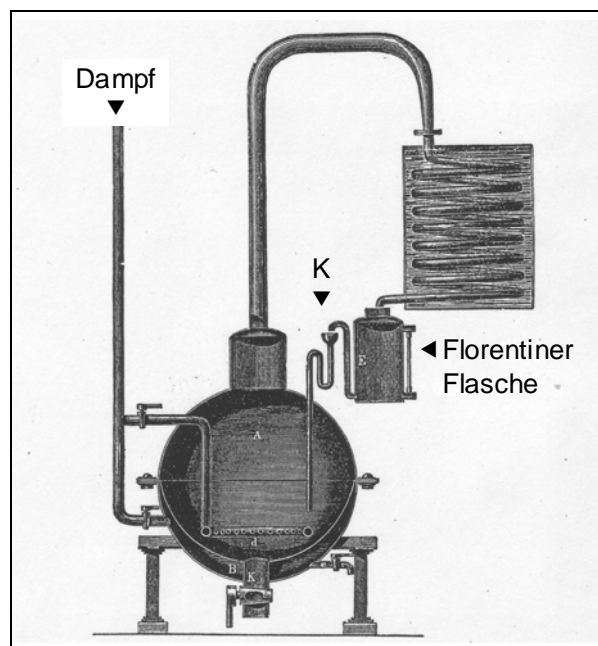
<b>Chemotypen</b>	<b>Ökologische Verbreitung</b>
1) Carvacrol-Typ	} heisse & trockene Areale
2) Thymol-Typ	
3) Linalool-Typ	} feuchte Areale
4) $\alpha$ -Terpineol-Typ	
5) Geraniol-Typ	} feuchte & kalte Areale
6) Terpinen-4-ol-Typ	} unbekannt

**Tab. 4:** Nach Hegnauer (1978) handelt es sich bei den Chemotypen von *Thymus vulgaris* um chemische Rassen mit spezifischen Verbreitungsarealen [27].

#### **6.1.3 Das Thymian Öl**

Die ätherischen Öle der Lamiaceen werden in speziellen Drüsenhaaren der Epidermis (Trichomen) gespeichert. In speziellen Sekretzellen der Trichome

wird das ätherische Öl gebildet und in den Sub-Cuticulaeren Raum sezerniert. Über den Sekretzellen entsteht eine mit ätherischem Öl gefüllte Blase, die eine "Sollbruchstelle" besitzt, welche die Freisetzung der ätherischen Öle erleichtert. Heutzutage wird Thymianöl hauptsächlich mittels Wasserdampfdestillation aus dem frischen oder getrockneten Kraut der beiden Arten *Thymus vulgaris* und *Thymus zygis* gewonnen. Aus dem rötlichen Rohöl wird durch Rektifikation "weisses Thymianöl" gewonnen, das eine gelbliche Farbe besitzt. Die Wasserdampfdestillation zur grossindustriellen Gewinnung ätherischer Öle, wie wir sie heute kennen, etablierte sich erst zu Beginn des 19. Jahrhunderts. Verglichen mit der herkömmlichen Destillation, bei der das Pflanzenmaterial in Wasser aufgeschwemmt und zusammen erhitzt wird, stellt sie ein schonendes Verfahren dar. Besonders die Verluste durch hydrolytische Reaktionen sind geringer. Nach der Destillation lassen sich Wasser und ätherisches Öl (mit Hilfe einer Florentiner Flasche) leicht voneinander trennen, da ätherisches Öl und Wasser nicht mischbare Flüssigkeiten sind. Da sich die phenolischen Verbindungen in Wasser aber verhältnissmässig gut lösen, wird die Destillation in der Regel mit Kohobation durchgeführt, um die phenolischen Verbindungen im Öl anzureichern. Das heisst, dass die wässrige Phase nach der Abtrennung des Öls, dem Destillationsprozess erneut zugeführt wird. Dadurch wird die wässrige Phase mit phenolischen Verbindungen bis zur Sättigung angereichert. Das erhöht die Konzentration der phenolischen Verbindungen im Öl und ermöglicht die in der wässrigen Phase gelösten phenolischen Verbindungen zurück zu gewinnen oder sie als Hydrolat zu verwenden. Thymian-Hydrolate werden v.a. äusserlich bei Akne, Dermatitis, Ekzemen und bei Insektenstichen verwendet [28].



**Abb. 9:** Wasserdampfdestillation um 1850.  
K = Kohobationskreislauf  
(aus: Gildenmeister 1956 [29])

#### 6.1.4 Traditionelle und moderne Anwendungen des Thymians

Der Thymian hat sowohl als Gewürz als auch als Arznei- und Heilpflanze eine lange Tradition. Und wie bei fast allen Arzneimitteln mit einer langen Tradition gibt es traditionelle Anwendungen die heute keine Gültigkeit mehr haben und andere die nach wie vor aktuell sind. Die alten Ägypter balsamierten ihre Mumien unter anderem mit thymianhaltigen ätherischen Ölen ein, um sie vor Fäulnis zu schützen. Die Römer, denen der Thymian als Gewürz sehr wichtig war, streuten getrockneten Thymian unter die Getreidevorräte, um diese länger haltbar zu machen. In Spanien Pflanzte man Gefäße, in denen man Wein oder Oliven aufbewahrte, mit einem Thymiansud auszuwaschen. Offensichtlich war die Eigenschaft des Thymians vor Fäulnis (bakterieller Zersetzung) zu schützen bereits in der Antike bekannt. Indikationen die damals ebenso gültig waren wie heute betreffen vor allem die antibakterielle Wirkung und die Wirkung als Mukolytikum, Expectorans und Spasmolytikum im Bereich der Lunge und des Gastrointestinaltraktes. Durch praktisch alle Epochen hindurch wurde der Thymian im europäischen Kulturkreis bei Bronchitis und bei Magen- und Darmbeschwerden verwendet.

#### **Der Thymian bei Pedanios Dioskurides: «Materia Medica» (1. Jh. n. Chr.)**

##### *Thymus vulgaris*

Der Thymos [Einige nennen ihn den weißen, Andere den kopfförmigen, Epithymis, Thyrsion, die Römer Thymus, die Ägypter Stephane, die Dakier Mozula] ist Allen bekannt. Es ist ein kleiner, sperriger, mit vielen schmalen Blättchen besetzter Strauch, welcher an der Spitze purpurrothe Blütenköpfchen trägt. Am meisten findet er sich in steinigen und magerbodigen Gegenden. Mit Salz und Essig getrunken hat er die Kraft, den Schleim durch den Bauch abzuführen. Die Abkochung davon mit Honig hilft bei Orthopnöe und Asthma, treibt den Bandwurm, den Embryo und die Nachgeburt aus und befördert die Menstruation. Er ist auch ein harntreibendes Mittel. Mit Honig als Leckmittel ist er ein Expectorans. Mit Essig umgeschlagen verteilt er frische Ödeme, löst das geronnene Blut auf und vertreibt Feigwarzen und gestielte Warzen. Er ist auch mit Wein und Graupen als Aufschlag ein gutes Mittel bei Ischias. Mit den Speisen genommen nützt er denen, die an Stumpfsichtigkeit leiden. Vorzügliche Verwendung findet er als Gewürz für die Gesunden.

**Der Thymian bei Leonhart Fuchs:  
«New Kreüterbuch» 1543**

Der Thym mit honig gesotten und getruncken ist bequem unnd nützlich denen so keichen und einen schweren athemb haben. Er treibt aus die würm / das bürdlein / bringt den frowen ire zeit / unnd zerteilt das gerunnen blut. ... Er vertreibt auch gewaltiglich die blaest und wind im bauch / mit honig und essig vermischt und übergelegt. Desgleichen thut er auch wan die gemecht aufgeblasen unnd geschwollen seind darüber geschlagen. ... Thym gestossen zu pulver und mit salz vermischt / zu der speis genützt / macht lust zu essen.

**Der Thymian bei Georg Friedrich Most:  
«Encyklopädie der Volksmedizin» (1843)**

Diese, bei uns in Gärten gebaute, kleine Pflanze, ähnlich dem wild wachsenden Quendel, wird nicht allein als Gewürz beim Wurstmachen benutzt, sondern dient auch als Hausmittel äusserlich zu trocknen, zertheilenden Umschlägen, wo das trockne Kraut und die Blumen mit Kamillen, Flieder u. s. w. in Kräutersäckchen aufgelegt werden. In früherer Zeit wandte man den Thymian auch innerlich an.

**Der Thymian bei Pfarrer Künzle:  
«Das grosse Kräuterheilbuch» (24. neubearbeitet Auflage 1974)**

Der echte Thymian der Mittelmeerländer enthält reichlich ein wohlriechendes ätherisches Öl. Er gilt als eines unserer besten Hustenmittel. Wegen der Krampflösenden Wirkung wird der Thymian insbesondere beim Keuchhusten der Kinder gebraucht. Aber auch beim Erwachsenen findet er reichlich Anwendung und fehlt kaum in einem Hustentee oder in einem Hustensaft.

**Der Thymian bei R.F. Weiss:  
«Lehrbuch der Phytotherapie» (6. Auflage 1985)**

... Die spasmolytische Wirkung auf den Krampf der Bronchien zeichnet den Thymian vor allem aus. Wir können ihn als ein Expektorans mit krampfstillender Wirkung charakterisieren und bekommen so gleichzeitig die Richtlinie für seine Anwendung. Überall, wo der Husten mit krampfhaften Erscheinungen einhergeht, kann der Thymian helfen. ... Was die Pfefferminze für Magen und Darm, das ist der Thymian für Luftröhre und Bronchien.



## Nachgewiesene Wirkungen von *Thymus vulgaris*

Pharmakologische & physiologische Wirkungen	Mögliche Anwendungen in der Praxis
antibakteriell	Antiseptisch bei Infektionen der Schleimhäute im Mund- und Rachenraum, bei Wunden und bei Bronchitis. <i>Helicobacter pylori</i> [30] Konservierungsmittel für: - Nahrungsmittel: [31-34] - pharmazeutische Produkte: [35]
antiviral	Herpes ( <i>Herpes simplex</i> ) [36]
antimykotisch	Dermatophytosen ( <i>Trichophyton</i> ) [37] Soor ( <i>Candida Arten</i> ) [6]
antiinflammatorisch ( <i>Hemmung der Prostaglandin-synthese</i> )	Fördert Wundheilung: [38]
antioxidativ	Konservierungsmittel für: - Nahrungsmittel: [39-41] - "antiaging": [42]
antithrombotisch (in-vitro)	"French Paradox": [43-44]
hemmt Acetylcholinesterase	Alzheimer: [45]
spasmolytisch [46] expektorierend	Bronchitis [47-48]
Repellens gegen diverse Insekten: [49-50]	

**Tab. 5:** Die pharmakologischen und physiologischen Wirkungen sind in vielen Fällen erst durch in-vitro und/oder in-vivo Experimente belegt. Für die Indikation Bronchitis gibt es bereits ausreichend klinische Belege.

### 6.1.5 Kultivierung und Ernte

Als Kulturpflanze wird der Thymian meistens zweijährig gehalten. Der Blattanteil erreicht im dritten Jahr, der Gehalt an ätherischen Ölen bereits im zweiten Jahr sein Maximum. Der Thymian ist wie die meisten Lippenblütler selbstunverträglich. Zwischen zwei Kulturen sollte deshalb eine Pause von vier Jahren eingelegt werden, bevor er auf demselben Boden wieder in Kultur genommen wird. Sein anfänglich langsames Wachstum erfordert relativ viel Pflege (Unkraut jäten). Er wird unmittelbar vor oder zur Blütezeit geerntet. Bei der Firma Bioforce beispielsweise wird die Frischpflanze sofort weiterverarbeitet. Thymian lässt sich aber auch ohne grosse Verluste des ätherischen Öls bei ca. 40-45 °C trocknen und bleibt in getrocknetem Zustand lange haltbar [51].



**Abb. 10:** Ein Thymianfeld der Firma Bioforce in Roggwil bei St. Gallen (Bild: F. Iten).

## 6.2 Die Farfalla-Öle

Die Experimente wurden mit zwei kommerziell erhältlichen Thymianölen von Farfalla durchgeführt (Chemotyp Carvacrol und Linalool). Im Laufe der Jahre 2005 bis 2007 wurden für die Versuche mehrmals ätherische Öle der Firma Farfalla erworben. Die Vorversuche, die in erster Linie der Klärung methodischer Fragen dienten, wurden mit Charge 1 durchgeführt. Die Chargen 2 & 3 wurden mittels Gaschromatographie analysiert. Sämtliche Experimente rund um die Fragestellungen der Interaktionen wurden mit den analysierten Ölen der Chargen 2 & 3 durchgeführt.

Chemotyp	Carvacrol Lot-Nr.	Datum	Linalool Lot-Nr.	Datum
Charge 1	02697	Mai 2005	11582	Mai 2005
Charge 2	10608	Juni 2006	126143	Juni 2006
Charge 3	097144	Juni 2007	10608	Juni 2007

Tab. 6: Die verwendeten Thymianöle von Farfalla.



Abb. 11: Die drei verschiedenen Batches der Farfalla-Öle  
(Batch1: 2005, Batch 2: 2006, Batch 3: 2007)  
(Zertifikat des Produzenten im Anhang)

### 6.2.1 Analytik der Farfalla-Öle

Zwei Chargen (2006 & 2007) der Chemotypen Carvacrol und Linalool wurden durch das zertifizierte Labor "Passafaro's Analytic Lab" mittels Gaschromatographie analysiert. Die Monosubstanzen von Fluka wurden als Referenzsubstanzen verwendet. Die GC-Analyse wurde mit einem HP 5890 Gas-Chromatographen durchgeführt. Als GC-Kapillare wurde eine DB-Wax fused silica Kapillare verwendet, mit Makrogel 20000 R als stationärer Phase mit einer Filmdicke von 0.25 µm, einer Länge von 30 m und einem Durchmesser von 0.25 mm. Trägergas war Wasserstoff. Die Flussrate betrug 4.3 ml/min. Die Ofentemperatur war folgendermassen programmiert: 60°C während 4 Minuten; mit 5°C/Min. auf 170°C; Haltezeit 15 Minuten; Laufzeit 40 Minuten. Einspritztemperatur war 220°C; Detektortemperatur 270°C; Injektionsvolumen 1 µl; Split Ratio 1:100. Als Referenzsubstanzen dienten Monosubstanzen der Firma Fluka. Folgende Monosubstanzen wurden von Fluka bezogen:

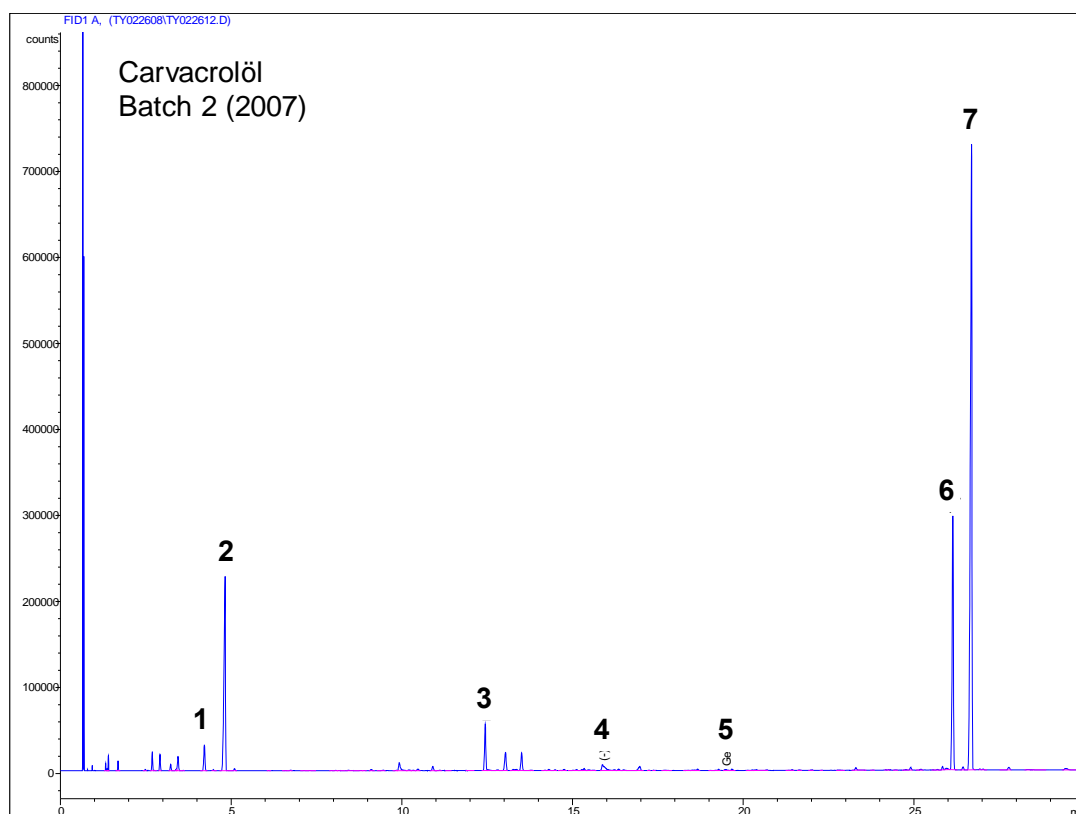
Substanz	Lot	Bestell-Nr.	Reinheit (%)
Carvacrol	1281965	22051	> 97.0
Thymol	1239340	89330	> 99.0
p-Cymen	1282027	30039	> 99.5
Linalool	1230021	62140	> 95.0
γ-Terpinen	1327393	86476	> 98.5
Borneol	1326329	15598	> 99.0
Geraniol	1330352	48798	> 99.0

**Tab. 7:** Die verwendeten Monosubstanzen von Fluka.

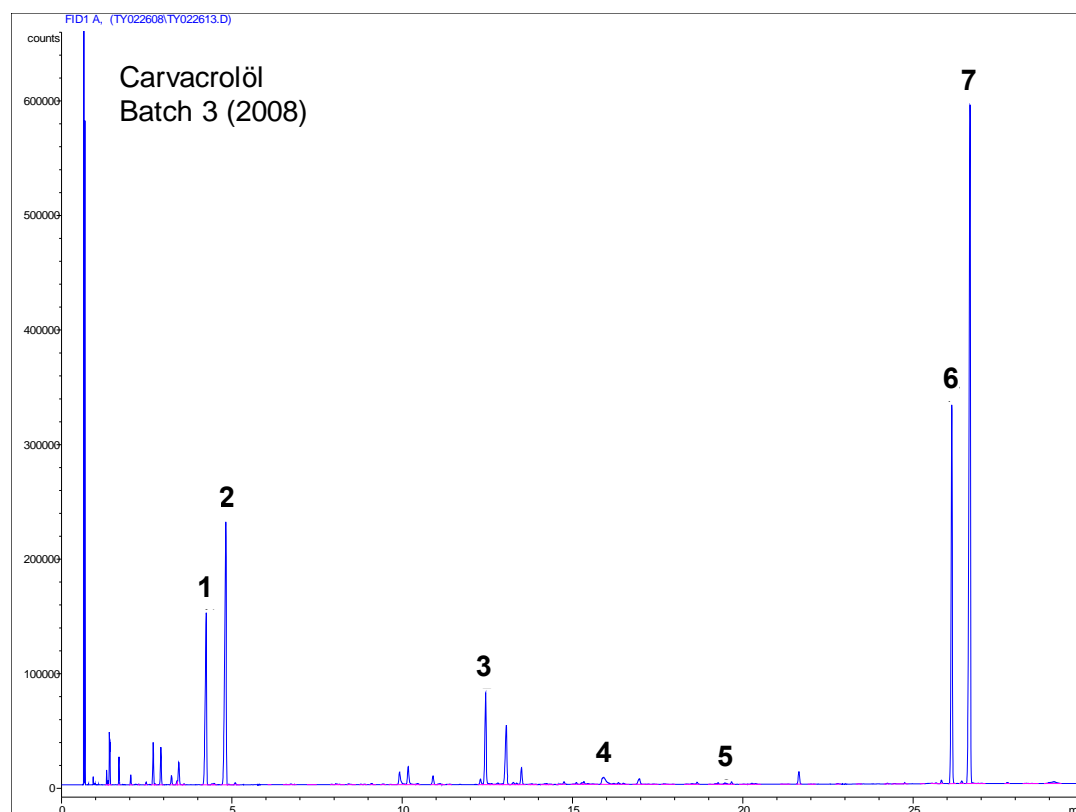


**Abb. 12:** Die fünf Hauptinhaltsstoffe des Thymianöls als Monosubstanzen der Firma Fluka (Geraniol, Linalool, p-Cymen, Carvacrol, Borneol, Thymol,  $\gamma$ -Terpinen).

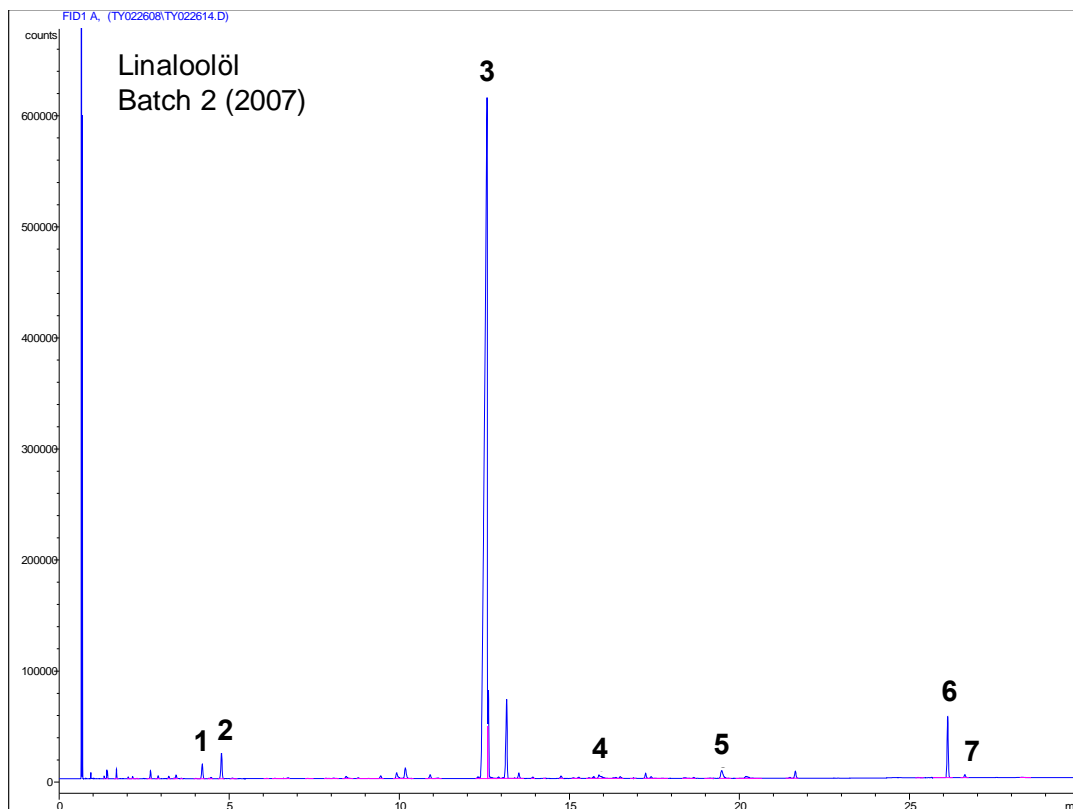




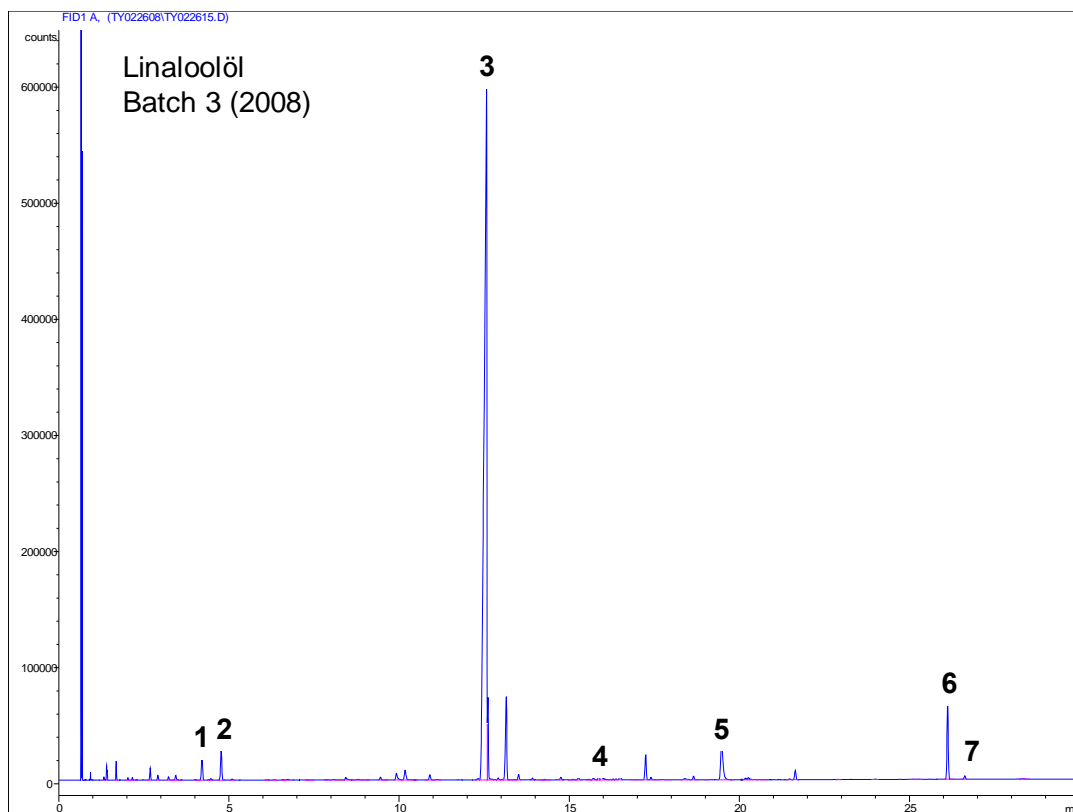
**Abb. 13:** Gaschromatogramm Chemotyp Carvacrol, Batch 1. 1)  $\gamma$ -Terpinen, 2) p-Cymen, 3) Linalool, 4) Borneol, 5) Geraniol, 6) Thymol, 7) Carvacrol.



**Abb. 14:** Gaschromatogramm Chemotyp Carvacrol, Batch 2. 1)  $\gamma$ -Terpinen, 2) p-Cymen, 3) Linalool, 4) Borneol, 5) Geraniol, 6) Thymol, 7) Carvacrol.



**Abb. 15:** Gaschromatogramm Chemotyp Linalool, Batch1. 1)  $\gamma$ -Terpinen, 2) p-Cymen, 3) Linalool, 4) Borneol, 5) Geraniol, 6) Thymol, 7) Carvacrol.



**Abb. 16:** Gaschromatogramm Chemotyp Linalool, Batch 2. 1)  $\gamma$ -Terpinen, 2) p-Cymen, 3) Linalool, 4) Borneol, 5) Geraniol, 6) Thymol, 7) Carvacrol.

<b>Chemotypen:</b>	<b>Carvacrol-Typ</b>		<b>Linalool-Typ</b>	
<b>Chargen:</b>	<b>Batch 2</b>	<b>Batch 3</b>	<b>Batch 2</b>	<b>Batch 3</b>
Carvacrol:	49.37	36.06	0.16	0.17
Thymol:	16.21	16.70	3.11	3.74
p-Cymen:	14.79	14.09	1.35	1.53
Linalool:	2.96	4.40	78.95	72.33
$\gamma$ -Terpinen:	1.58	8.52	0.73	1.29
Borneol:	1.02	1.12	0.47	0.41
Geraniol:	0.13	0.12	0.79	3.47
<b>Summe:</b>	<b>86.06</b>	<b>81.01</b>	<b>85.56</b>	<b>82.94</b>

**Tab. 8:** Zusammenfassung der GC-Analytik (Angaben in %).

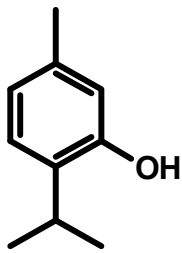
Externe Faktoren wie Boden, Klima, Wetter und Erntezeitpunkt haben zumindest auf die quantitative Zusammensetzung der ätherischen Öle einen ganz erheblichen Einfluss. Es sind deshalb sowohl von Ernte zu Ernte, als auch von Anbaugebiet zu Anbaugebiet quantitative Unterschiede in der Zusammensetzung der Öle zu erwarten. Das Europäische Arzneibuch schreibt für Thymianöl (Thymi aetheroleum) 36–55% Thymol, 1–4% Carvacrol und 4–6.5% Linalool vor. Die Gc-Analytik zeigte, dass es sich beim vermeintlichen Thymoltyp von Farfalla um einen Carvacroltyp oder um eine Mischung verschiedener Chemotypen (v.a. Carvacrol- und Thymoltypen) handeln musste. Im Folgenden wird der "Thymoltyp" als Carvacroltyp bezeichnet. Die Analytik des Linalooltyps entsprach weitgehend den Erwartungen bezüglich der Inhaltsstoffe.

### 6.2.2 Charakterisierung der Monosubstanzen

Alle mittels GC erfassten Inhaltsstoffe zählen zu den Monoterpenen (C<sub>10</sub>). Es handelt sich dabei um Monoterpene, die bei Lamiaceen weit verbreitet sind. Gamma-Terpinen und p-Cymen sind Vorläufersubstanzen des Carvacrols und Thymols. Im Laufe der Vegetationsperiode verändert sich das Spektrum der Inhaltsstoffe auf Kosten dieser Vorläufersubstanzen zu Gunsten der Endprodukte Carvacrol und Thymol [52-53].



**Thymol** (phenolisches Monoterpen):



Chem. Bezeichnung: 2-Isopropyl-5-Methyl-phenol

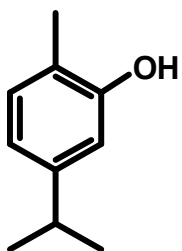
Summenformel:  $C_{10}H_{14}O$

Aggregatzustand: fest (Smp.  $51.5^{\circ}C$ )

Dichte:  $0.97\text{ g/cm}^3$

Löslichkeit:  $0.84\text{ g/l}$  Wasser

**Carvacrol** (phenolisches Monoterpen):



Chem. Bezeichnung: 3-Isopropyl-6-Methyl-phenol

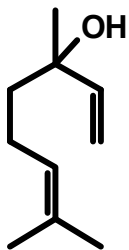
Summenformel:  $C_{10}H_{14}O$

Aggregatzustand: flüssig (Smp.  $3-4^{\circ}C$ )

Dichte:  $0.97\text{ g/cm}^3$

Löslichkeit:  $0.84\text{ g/l}$  Wasser

**Linalool** (acyclisches Monoterpen, einwertiger, tertiärer Alkohol):



Chem. Bezeichnung: 3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol

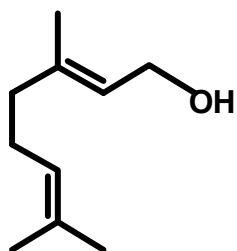
Summenformel:  $C_{10}H_{18}O$

Aggregatzustand: flüssig

Dichte:  $0.87\text{ g/cm}^3$

Löslichkeit:  $1.45\text{ g/l}$  Wasser (bei  $20^{\circ}C$ )

**Geraniol** (acyclischer Monoterpen-Allylalkohol):



Chem. Bezeichnung: 3,7-Dimethyl-trans-2,6-octadien-1-ol

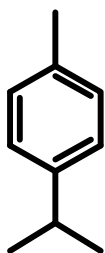
Summenformel:  $C_{10}H_{18}O$

Aggregatzustand: flüssig

Dichte:  $0.89\text{ g/cm}^3$

Löslichkeit:  $0.66\text{ g/l}$  Wasser (bei  $20^{\circ}C$ )

**p-Cymen** (cyclisches Monoterpen):



Chem. Bezeichnung: 1-Isopropyl-4-methylbenzen

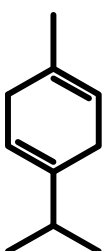
Summenformel:  $C_{10}H_{14}$

Aggregatzustand: flüssig

Dichte:  $0.861 \text{ g/cm}^3$

Löslichkeit:  $0.013 \text{ g/l}$  Wasser (bei  $20^\circ\text{C}$ )

**Gamma-Terpinen** (cyclisches Monoterpen):



Chem. Bezeichnung: 1-Isopropyl-4-methyl- 1,4-cyclohexadien

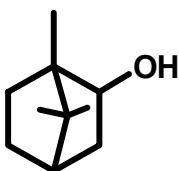
Summenformel:  $C_{10}H_{16}$

Aggregatzustand: flüssig

Dichte:  $0.847 \text{ g/cm}^3$

Löslichkeit: keine Angaben

**Borneol** (bicyclisches Monoterpen, einwertiger, sekundärer Alkohol):



Chem. Bezeichnung: 1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]-heptan-2-ol

Summenformel:  $C_{10}H_{18}O$

Aggregatzustand: fest

Dichte:  $0.992 \text{ g/cm}^3$

Löslichkeit:  $4.3 \text{ g/l}$  Wasser (bei  $20^\circ\text{C}$ )

### 6.2.3 Vorbereitung der ätherischen Öle

Unmittelbar vor jedem Experiment wurden 1%-ige Stammlösungen der zu verwendenden ätherischen Öle hergestellt, die für weitere Verdünnungen verwendet wurden. Dazu wurden 1.5 ml Reaktionsgefäße mit 1%-igem Müller-Hinten-Agar beladen und anschliessend eine entsprechende Menge des ätherischen Öls bzw. der Monosubstanz zugegeben, um eine 1%-ige Suspension zu erhalten. Die 1%-ige Suspension wurde kräftig geschüttelt und fünf Minuten stehen gelassen bevor sie für weitere Verdünnungsschritte verwendet wurde. Obwohl die Konzentration etwa das 10-Fache der Wasserlöslichkeit betrug, waren diese Suspensionen in 1%-igem Agar sehr stabil, lieferten gut

reproduzierbare Resultate und unterschieden sich nicht von Ansätzen mit 0.1%-igen Stammlösungen. Die Monosubstanzen Thymol und Borneol, die bei Raumtemperatur als Feststoffe vorliegen, wurden in reinem Alkohol (98%) in einer Konzentration von 40% gelöst (Gewichtsprozente). Die daraus hergestellten 1%-igen Stammlösungen enthielten noch 1.5% Ethanol. Vorgängige Untersuchungen zeigten, dass Alkoholkonzentrationen bis zu 10% weder das Wachstum der Mikroorganismen noch die MHK beeinflussten.

## 6.3 Antibiotika

Die beiden bakterizid wirkenden Antibiotika Ampicillin und Gentamycin, wurden als Positivkontrollen und zur Kontrolle allfälliger Resistenzentwicklungen eingesetzt. Ampicillin (Ampicillin Natrium-Salz; Reinheit 99.0%) ist ein  $\beta$ -Lactam Antibiotikum, das in die Zellwandsynthese eingreift. Gentamycin, ein Aminoglycosid, hemmt die Proteinsynthese indem es irreversibel an die 30S Untereinheit der Ribosomen bindet. Gentamycin lag als Sulfat vor mit einer spezifischen Aktivität von 600  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . Bei *Candida albicans* wurden keine Antimykotika als Positivkontrolle mitgeführt, da das Hauptinteresse den Bakterien galt. Beide Antibiotika sind gut wasserlöslich und wurden in destilliertem Wasser gelöst. Aliquots von 100  $\mu\text{l}$  einer 5%-igen Stammlösung wurde angesetzt und als Stocksolutions eingefroren und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

## 6.4 Mikroorganismen

Die Auswahl der Mikroorganismen erfolgte in erster Linie aufgrund klinischer Kriterien. Es wurden Mikroorganismen ausgewählt, bei denen der Einsatz von Thymianöl eine therapeutische Option darstellen kann.

Folgende Mikroorganismen wurden ausgewählt:

### Grampositive Bakterien:

- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (Sta) [DSM-Nr.: 799]
- *Staphylococcus epidermidis* (Ste) [DSM-Nr.: 20044]
- *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* (Sap) [DSM-Nr.: 20229]

### Gramnegative Bakterien:

- *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (KI) [DSM-Nr.: 681]
- *Escherichia coli* (Ec) [ATCC-Nr.: 25922]

### Hefepilze:

- *Candida albicans* (Ca) [DSM-Nr.: 1386]

### 6.4.1 *Staphylococcus aureus*

**Merkmale:** grampositive Kokken, Koagulase positiv, fakultativ anaerob, gelb pigmentierte Kolonien

**Übertragung:** Schmierinfektionen und Aerosole. *S. aureus* ist als gram-positiver Keim gegenüber Austrocknung sehr widerstandsfähig. Er wird deshalb nicht nur über Tröpfchen, sondern auch in Staubpartikeln durch die Luft verbreitet. Aerosole sind Gemenge aus Luft und festen oder flüssigen Schwebstoffen mit 0.01 – 10.0 µm Durchmesser. Aerosole gelangen bis in die Lungenalveolen.

**Klinik:** *S. aureus* ist aus humanmedizinischer Sicht die wichtigste Spezies unter den Staphylokokken. Die klinische Symptomatik wird durch eine Reihe von extrazellulären Enzymen und Exotoxinen bestimmt. Als Antibiotika werden penicillinasefeste Penicilline verwendet.

Staphylokokken sind Saprophyten der Haut und Schleimhaut. Bis zu 50% der Gesunden tragen *S. aureus* im Nasen-Rachen-Raum. Bedeutend höher ist die Besiedlung des Nasen-Rachen-Raumes durch *S. aureus* beim Spitalpersonal und den Ärzten. *S. aureus* ist ein häufigster Erreger nosokomialer Infektionen. *S. aureus* verursacht ca. 20% aller nosokomialen Sepsen. Auch die Lebensmitteltechnologie beschäftigt sich mit Staphylokokken weil sie Lebensmittel besiedeln und Toxine bilden können.

**Therapie:** penicillinasefeste Penicilline



### 6.4.2 *Staphylococcus epidermidis*

**Merkmale:** grampositive Kokken, Koagulase positiv, fakultativ anaerob, nicht pigmentierte Kolonien

**Übertragung:** Infektionsquelle ist die körpereigene Kolonisationsflora.

**Klinik:** Saprophyt der Haut und Schleimhäute. Besiedelt Kunststoffe, und bildet dabei eine Schleimhülle aus Polysacchariden. Kann bei Patienten mit intravasalen Kathetern aus Kunststoff Sepsis verursachen. Harnwegsinfekte, etc.

**Therapie:** Penicilline und Cephalosporine



### 6.4.3 *Staphylococcus saprophyticus*

**Merkmale:** grampositive Kokken, Koagulase positiv, fakultativ anaerob, nicht pigmentierte Kolonien.

**Übertragung:** Infektionsquelle ist die körpereigene Kolonisationsflora.

**Klinik:** Saprophyt der Haut und Schleimhaut. Häufig Kontaminationskeim klinischen Untersuchungsmaterials. Harnwegsinfekte

**Therapie:** Penicilline und Cephalosporine



### 6.4.4 *Klebsiella pneumoniae* (Enterobakterien)

**Merkmale:** gramnegative Stäbchen, fakultativ anaerob, Katalase positiv

**Übertragung:** Auf Schleimhäuten des Respirationstraktes und im Darm von Tier und Mensch vorhanden. Infektionsquelle ist die körpereigene Kolonisationsflora.

**Klinik:** Erreger von Pneumonien, Harnwegsinfekten, Cholezystitis, Sinusitis, Meningitis, Polysaccharid-Schleimkapsel erschwert die Phagozytose.

**Therapie:** Cephalosporine, Aminoglykoside, Gyrasehemmer



### 6.4.5 *Escherichia coli* (Enterobakterien)

**Merkmale:** gramnegative Stäbchen, fakultativ anaerob, Katalase positiv

**Übertragung:** Gehört zur physiologischen Darmflora. Infektionsquelle ist die körpereigene Kolonisationsflora. Indikator für fäkale Verunreinigung von Wasser und Lebensmitteln.

**Klinik:** Kann Entzündungen hervorrufen, z.B.: Urethritis, Zystitis, Pyelitis, ...

**Therapie:** Gyrasehemmer, Aminoglykoside





### 6.4.6 *Candida albicans*

**Merkmale:** Sprosspilz mit Pseudomycel, fakultativ pathogener Erreger

**Übertragung:** Physiologische Besiedlung der Schleimhäute des oberen Respirationstraktes, des Gastrointestinaltraktes und des Urogenitaltraktes. Infektionsquelle ist die körpereigene Kolonisationsflora.

**Klinik:** Häufigster Erreger von (opportunistischen) Mykosen beim Menschen (Soor). Manifestieren sich nur bei entsprechender Disposition.

**Therapie:** topisch Nystatin & Azole; systemisch Amphotericin B  
(Quellen: [54-57])



## 6.5 Methodik

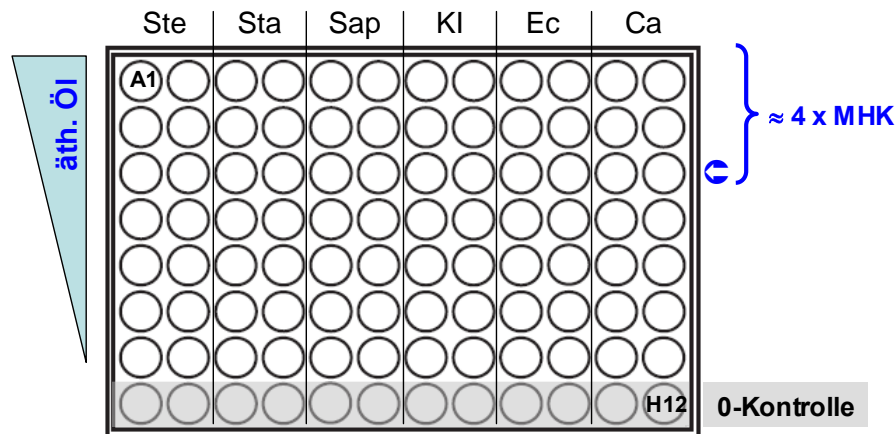
### 6.5.1 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Zur Bestimmung der MHK wurden 96-well Mikrotiterplatten des Typs Rotilabo-Mikrotest-Platten aus Polystyrol (U-Profil) verwendet (Firma: Roth). Um die Verdünnungsreihen zu erstellen wurden sämtliche Wells vorgängig mit jeweils 100 µl Müller-Hinton (MH) Medium beschickt, das 0.1% Agar enthielt. Anschliessend wurde die oberste Reihe (A1 bis A12) mit der entsprechenden Konzentration des ätherischen Öls (in 0.1%-Agar) beladen, mit drei Pipettierstössen durchmischt und davon pro Well je 100 µl in die darunter liegende Reihe (B1 – B12) gegeben. Dieses Procedere wurde fortgesetzt bis zur vorletzten Reihe (G1 – G12). Die letzte Reihe (H1 – H12) diente als Nullkontrolle und blieb frei von ätherischen Ölen. Zuletzt wurden pro Well 100 µl Mikroorganismen zugegeben, und zwar in einer Konzentration von ca.  $2 \cdot 10^5$  kolonienbildenden Einheiten pro Milliliter (colony-forming units per milliliter = cfu/ml). Das Müller-Hinten Medium zur Verdünnung der Mikroorganismen enthielt kein Agar (Agar-Endkonzentration = 0.05%).

Da die MHK-Werte der sechs untersuchten Mikroorganismen nur wenig voneinander abwichen, konnte mit einer Mikrotiterplatte gleichzeitig der MHK-Wert aller sechs Mikroorganismen im Doppel bestimmt werden (Abb. 2).

Die Auswertung erfolgte visuell. Die Konzentration des ersten Wells, das keine sichtbare Trübung aufwies, wurde als MHK-Wert bestimmt. Die Mikrotiterplatten wurden dazu gegen eine Lichtquelle gehalten, um auch Ansätze leichter Trübungen zu erkennen.

Bei den schwach antibiotisch wirksamen Thymian-Extrakten (Bionorica) stiess die visuelle Auswertung an ihre Grenzen, weil das Medium bei den erforderlichen Konzentrationen sehr intensiv grün gefärbt war.



**Abb. 17:** Ansatz einer 96-Well-Mikrotiterplatte zur gleichzeitigen Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) aller sechs Mikroorganismen.

Die MHK-Werte der Antibiotika viel weiter auseinander, weshalb die Verdünnungsreihen entlang der 12 zur Verfügung stehenden Spalten angesetzt wurden. Die Verdünnungsschritte entsprachen einer geometrischen Verdünnungsreihe mit dem Verdünnungsfaktor  $\frac{1}{2}$ .  $\Rightarrow C_n = C_0 \cdot (\frac{1}{2})^n$

### 6.5.2 Bestimmung der Minimalen Bakteriziden Konzentration (MBK)

Die Minimale bakterizide Konzentration (MBK) wurde bestimmt, indem der ersten Zelle ohne sichtbares Wachstum (MHK) und zwei darüber liegenden Zellen mit zwei- und vierfacher Konzentration des ätherischen Öls jeweils zwei Aliquots à 20 µl entnommen und auf eine Müller-Hinton-Agarplatte übertragen wurden. Die Agarplatten wurden bei 37°C 24 Stunden bebrütet. Anschliessend wurden die Kolonien ausgezählt und mit der für eine MBK erforderlichen Keimzahlreduktion von 99.9% (Reduktion um  $10^{-3}$  cfu/ml) verglichen.

### 6.5.3 Die Checkerboard-Methode

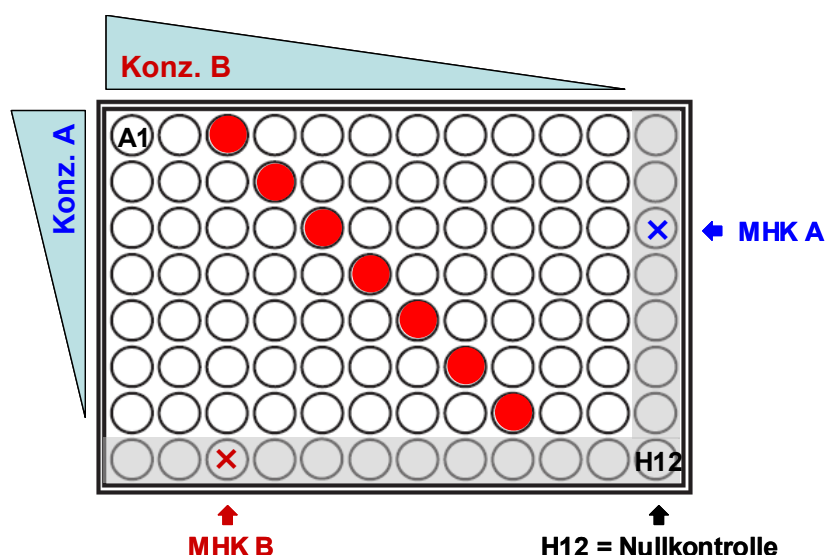
Der Checkerboard-Assay ist die Methode der Wahl, um stoffliche Kombinationswirkungen ausfindig zu machen und zu quantifizieren. Als Messpunkte dienen die MHK-Werte der Einzelstoffe (MHK von A & B) und die MHK-Werte der Kombinationen (MHK's von  $[A_i/B_i]$ ). Die Mikrotiterplatten werden dazu so beladen, dass zwei rechtwinklig sich überlagernde Konzentrationsgradienten entstehen (Abb. 18 und 19). Die Verdünnungsreihe des Stoffes A erstreckte sich beispielsweise über die Reihen A–G, wobei die

Reihe H für die Bestimmung der MHK von B frei bleibt und die Verdünnungsreihe des Stoffes B reicht von der Spalte 1–11, wobei die Spalte 12 für die Bestimmung der MHK von A frei bleibt. Die Zelle H 12 enthält weder Stoff A noch B und bildet somit die Nullkontrolle. Dabei entstehen Diagonalen mit Zellen bestimmter Mischungsverhältnisse (A/B) in abnehmenden Konzentrationen [A/B]. Auf Grund der Streuung der Messwerte von durchschnittlich  $\pm 1$  MHK und um auch allfällige antagonistische Effekte erfassen zu können wurden die Konzentrationen der beiden Stoffe so gewählt, dass die MHK voraussichtlich im dritten Verdünnungsschritt erreicht wurde. Zum Beladen einer Platte waren insgesamt vier Pipetierschritte erforderlich: Vorlage, Substanz 1, Substanz 2 und Mikroorganismen  $[(1/2)^4]$ . Jeder der vier Pipetierschritte stellt eine potentielle Fehlerquelle dar und trägt damit zur Streuung der Ergebnisse bei. Hinzu kommt, dass die Anfangskonzentrationen entsprechend hoch gewählt werden mussten, um die Verdünnungsreihen überhaupt erstellen zu können. Vor jedem Experiment wurden 1%-ige Lösungen der ätherischen Öle in 0.05% Agar frisch hergestellt.



**Abb. 18:** Eine 96-Well-Mikrotiterplatte eines Checkerboard Assay nach 24 Stunden Bebrütung bei 37°C.





**Abb. 19:** Darstellung des Chequerboard-Assay. Die Konzentrationsgradienten der zu untersuchenden Inhaltsstoffe überlagern sich rechtwinklig und erstrecken sich bis zur letzten Reihe bzw. Spalte. Die letzte Reihe bzw. Spalte dient jeweils der Bestimmung der aktuellen MHK der Einzelstoffe. Die Zelle H12 stellt die Nullkontrolle dar. Die Diagonale mit rot gefüllten Zellen stellt eine Reihe konstanter Mischungsverhältnisse dar mit von links oben nach rechts unten abnehmenden Konzentrationen.

### 6.5.3.1 Der Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI)

Ein einfaches und bewährtes Verfahren zur Quantifizierung der Daten des Checkerboard-Assay stellt der Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) dar. Eingeführt von Elion [58] ist es insbesondere den Arbeiten von Berenbaum [59] zu verdanken, dass sich der FICI inzwischen etabliert hat. Der FICI hat mittlerweile Eingang in Standardwerke der Mikrobiologie gefunden [60]. Berenbaum konnte zeigen, dass die lineare Referenzlinie, wie sie sich aus dem algebraischen Modell der FICI-Berechnung ergibt, eine allgemeingültige Basis für die Einschätzung von Kombinationseffekten liefert, ganz unabhängig von den zugrunde liegenden Mechanismen [59]. Das algebraische Modell des FICI ist also ein robustes und für viele (insbesondere pharmakologische) Fragestellungen geeignetes Modell, um synergistische und antagonistische Interaktionen zu quantifizieren. Die einzige Grundvoraussetzung für seine Brauchbarkeit besteht im Nachweis der rein additiven Wirkung des Kontrollansatzes (Scheinkombination bzw. Sham-Assay) [22]. Es handelt sich also um ein empirisches Modell, das keinerlei Kenntnisse der Wirkmechanismen voraussetzt, dessen Ergebnisse aber auch keine direkten Hinweise über die Wirkmechanismen liefern.

### 6.5.3.2 Berechnung der FICI-Werte

Der Checkerboard-Assay liefert eine Reihe von Messpunkten. Einerseits die MHK-Werte verschiedener Kombinationen ( $A_k/B_k$ ) aber auch die MHK-Werte

der eingesetzten Einzelstoffe ( $A_a$  und  $B_a$ ). Aus diesen Messpunkten lassen sich die FICI-Werte als Summe zweier Quotienten wie folgt berechnen:

$$\text{FICI} = \frac{\text{MHK A in Kombination}}{\text{MHK A allein}} + \frac{\text{MHK B in Kombination}}{\text{MHK B allein}} = \frac{A_k}{A_a} + \frac{B_k}{B_a}$$

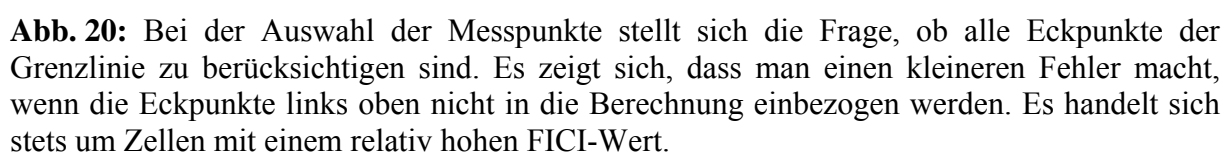
Der FICI-Wert ist eine dimensionslose Zahl, da sich die Einheiten [ $\mu\text{g/ml}$ ] in den Quotienten herauskürzen. Der einzige FICI-Wert, dessen Interpretation sich aus der Formel zwanglos erschliesst, ist der Wert 1 für die Indifferenzlinie (Referenzlinie). Wie die Kontrollen (Sham-Assay) jedoch zeigten, streuten die Werte um die Indifferenzlinie. Nicht jede beliebige Abweichung von der Indifferenzlinie kann deshalb bereits als synergistischen oder antagonistischen Effekt angesehen werden. Neben diesen statistischen Streuungen spielten zweifellos klinische Aspekte eine wichtige Rolle, die viele renommierte Fachzeitschriften veranlassten, einen Grenzwert für Synergismus und Antagonismus einzuführen (Odds). Die Notwendigkeit einer Abgrenzung von irrelevanten Effekten und Streuungen ist unbestritten, wenn auch das willkürlich gesetzte Mass ( $\text{FICI} \leq 0.5$ ) in einzelnen Fällen nicht gerechtfertigt sein mag. Effekte mit einem FICI-Wert zwischen 0.5 und 1 können insbesondere dann von klinischer Bedeutung sein, wenn die Kombination gleichzeitig geringere Nebenwirkungen aufweist (Synergismus der Wirkung & Antagonismus der Nebenwirkungen). Die vorliegende Arbeit orientiert sich an den weitgehend etablierten Wertebereichen für den FICI, wie er vom *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, dem Mikrobiologie Lehrbuch *Lorian* und der *American Society of Microbiology* vorgeschlagen werden. Die allgemeine Isobolengleichung beschreibt die Berechnung des FICI für Kombinationen mit n Stoffen.

#### Die Wertebereiche des FICI:

synergistisch	additiv bzw. indifferent	antagonistisch
$\text{FICI} < 0.5$	$0.5 \leq \text{FICI} \leq 4$	$4 < \text{FICI}$

$$\text{Allgemeine Isobolengleichung: } \sum_{i=1}^n \frac{[x_i]_k}{[X_i]_a} = 1$$

Die Messpunkte des Checkerboard-Assay bildet jene Reihe von Zellen ohne sichtbares Wachstum, die an die Zellen mit sichtbarem Wachstum grenzen. Es gibt jedoch verschiedene Möglichkeiten diese Grenzlinie zu ziehen. Man kann Diagonalen zwischen den Zellen zulassen oder nur rechtwinklige Grenzverläufe akzeptieren, man kann zwischen den beiden möglichen rechten Winkeln unterscheiden (Ecke links oben bzw. Ecke rechts unten) und nur bei einer Sorte von Eckpunkten Diagonalen zulassen. Da es sich um stufenweise Messungen handelt (intervallskaliert), ist die Wahrscheinlichkeit gross, dass sich der eigentliche MHK-Wert eher zwischen zwei Zellen mit und ohne Wachstum des gleichen Mischungsverhältnisses befindet als exakt in der Zelle ohne Wachstum. Es stellt sich nun die Frage, ob Zellen, die in einer linken oberen Ecke liegen, zur Grenzlinie zählen sollen, denn es sind immer Zellen mit relativ hohen Werten. Wählt man 4 Zellen der Mikrotiterplatte so aus, dass sie ein Quadrat bilden und berechnet die Mittelwerte der beiden diagonal gegenüberliegenden Zellen, so wird man stets zwei identische Mittelwerte erhalten. Es ist dies auf der einen Seite der Mittelwert von zwei Zellen ohne Wachstum mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (Zellen links unten & rechts oben) und auf der anderen Seite der Mittelwert aus einer Zelle mit und einer Zelle ohne Wachstum eines Mischungsverhältnisses (farbig dargestellt) das zwischen den anderen beiden Mischungsverhältnissen liegt. Man darf deshalb annehmen, dass die MHK des mittleren Mischungsverhältnisses (farbig) eher dem berechneten Mittel entspricht als der Zelle des fraglichen Eckpunktes. Wir begehen also einen kleineren Fehler, wenn wir diese Eckpunkte aus unserer Berechnung ausschliessen, als wenn wir sie in die Berechnung aufnehmen.



#### 6.5.3.4 Test auf Signifikanz

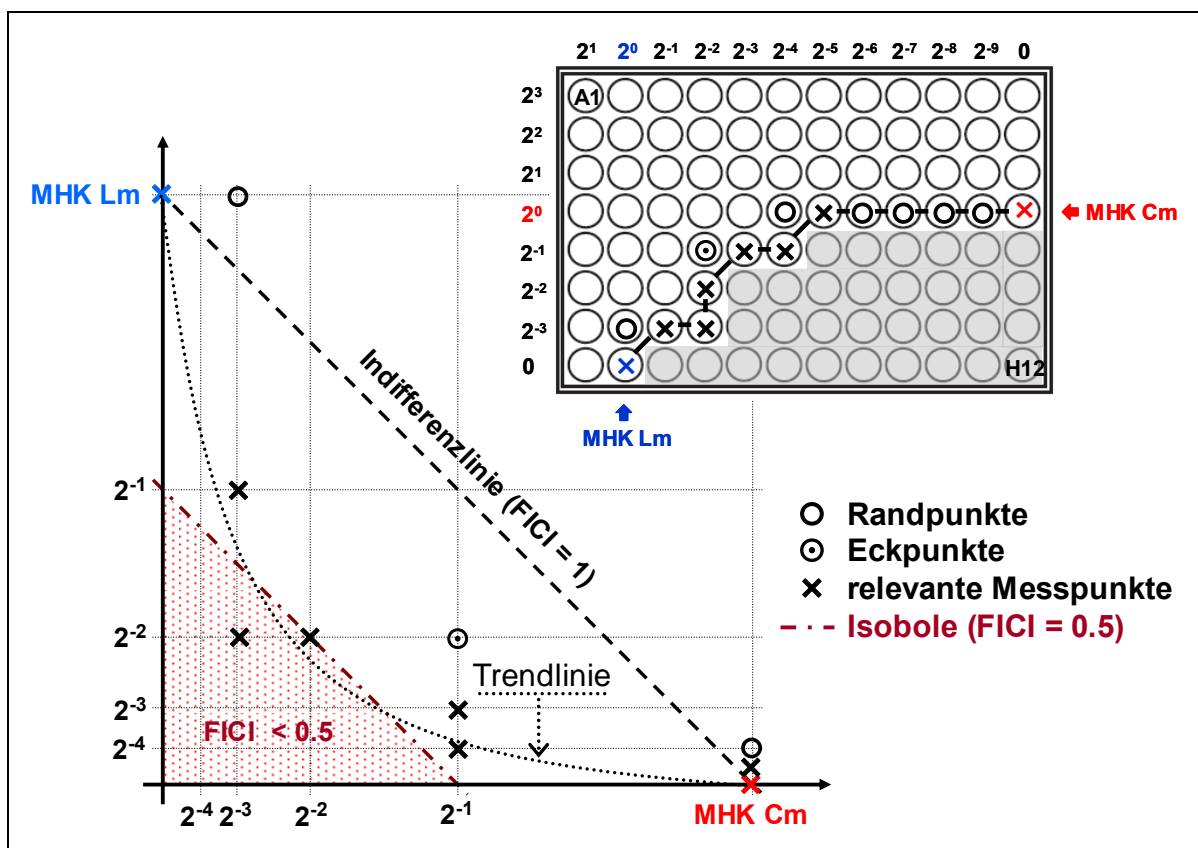
Die FICI-Werte von Checkerboard-Assays mit Isobologrammen, die einen deutlichen Trend in Richtung Synergismus zeigten, wurden statistisch ausgewertet. Randpunkte ( $1/B_y$ ) und ( $A_x/1$ ) wurden von der statistischen Auswertung grundsätzlich ausgeschlossen, da in diesen Fällen keine Interaktion stattfindet, sondern der in der höheren Konzentration vorliegende Stoff allein die Wirkung bestimmt. Von den restlichen FICI-Werten wurden der Mittelwert und das 95%-Konfidenzintervall bestimmt, und zum Testen der Hypothese ( $H_0 = 0.5$ ) verwendet.

#### 6.5.3.5 Isobologramme

Isobologramme dienen in erster Linie der Veranschaulichung der Daten, die mittels Checkerboard-Assay gewonnen wurden. Sie verschaffen dem geübten Leser einen schnellen Überblick über allfällige synergistische oder antagonistische Interaktionen. Die erste wissenschaftliche Publikation, die ein Isobologramm zur Darstellung einer interaktiven Wechselwirkung enthielt, erschien 1872 von Fraser et al. [61]. Es handelte sich um die antagonistische Interaktion zwischen Physostigmin und Atropin, die als Antidote bei allfälligen Vergiftungen durch den antagonistischen „Partner“ eingesetzt werden können. Isobologramme dienen der graphischen Darstellung der Checkerboard-Daten, insbesondere der Darstellung der FICI-Werte, die sich aus den Daten des Checkerboard-Assays errechnen lassen. Isobolen sind Linien gleicher Wirkintensität, das heisst, Linien gleicher FICI-Werte. Das Grundgerüst der graphischen Darstellung wird von zwei Koordinatenachsen aufgespannt, die die Konzentrationen der eingesetzten Stoffe repräsentieren. Die Konzentrationen können entweder direkt in  $[\mu\text{g/ml}]$  angegeben sein oder sie werden auf 1-MHK standardisiert, was zu einer identischen Unterteilung der beiden Achsen führt und die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Ansätze erleichtert. Aus solchen Isobologrammen lassen sich jedoch keine Rückschlüsse über die tatsächlichen Konzentrationsverhältnisse ziehen. Diese sollten in solchen Fällen separat angegeben werden. Wenn sich aufgrund der Messpunkteverteilung im Isobologramm ein Trend abzeichnet, wird oft mit Hilfe geeigneter mathematischer Modelle eine Trendlinie hinzugefügt, um diesen Trend zu veranschaulichen. Trendlinien sind aber keine Isobolen, obwohl sie in der Literatur oft als solche bezeichnet werden. Die direkte Verbindung zwischen dem MHK-Wert von Stoff A und Stoff B ist die so genannte Indifferenzlinie. Idealerweise liegen die Messpunkte beim Kontrollansatz (Sham-Assay) auf der Indifferenzlinie. Beim Kontrollexperiment bestehen die beiden orthogonal aufeinander stehenden Konzentrations-Gradienten aus dem gleichen Stoff. Die MHK wird erwartungsgemäss dann erreicht, wenn die Summe der beiden Teilkonzentrationen der MHK entspricht. Die Indifferenzlinie kann deshalb

auch als eine Reihe von Erwartungswerten für rein additive Interaktionen angesehen werden. Ist die Summe der Teilkonzentrationen, gemessen in MHK, in einer Zelle ohne Wachstum kleiner als 1-MHK, dann wirkt die eingesetzte Kombination in dieser Zelle besser als die Einzelstoffe. Ist die Summe der Teilkonzentrationen in einer Zelle ohne Wachstum grösser als 1-MHK, dann wirkt die eingesetzte Kombination in dieser Zelle schlechter als die Einzelstoffe.

Der synergistische Bereich wird durch die Isobole mit  $FICI = 0.5$  und durch Abszisse und Ordinate begrenzt. Der antagonistische Bereich ist gegen oben grundsätzlich offen. Mitunter wird das Gebiet oberhalb der Indifferenzlinie, das durch die Senkrechte und die Waagrechte begrenzt wird, die durch die beiden MHK-Werte laufen, als antagonistisch bezeichnet und das Gebiet ausserhalb des antagonistischen Bereiches als inhibitorisch oder absolut antagonistisch (Abb. 3).



**Abb. 21:** Darstellung eines Checkerboard-Assays und des dazugehörigen Isobologramms. Die relevanten Messpunkte sind mit einem x markiert. Randpunkte, die nicht in die Auswertung einfließen als leere Kreise dargestellt und ein streitbarer Messpunkt als Kreis mit Punkt. Das gepunktete Feld stellt den Bereich der synergistischen Wirkung dar ( $FICI < 0.5$ ).

### 6.5.3.6 Trendlinien

Trendlinien dienen der Veranschaulichung einer erkennbaren Entwicklungsrichtung. Sie basieren auf mathematischen Modellen, die aufgrund eines vermuteten oder bereits sichtbaren Trends ausgewählt werden. Anhand des zu erwartenden Trends wurde eine Exponentialfunktion folgenden Typs verwendet:  $y = a \cdot e^{-\lambda \cdot x}$ . Für Isobologramme, bei denen sich ein Trend abzeichnete, wurden die beiden unbekannten Parameter  $a$  und  $\lambda$  mittels nichtlinearer Regression berechnet und die Trendlinie eingezeichnet. Da die Trendlinien ausschliesslich der Veranschaulichung der Trends dienten, wurden keine Korrelationskoeffizienten und Bestimmtheitsmasse berechnet.

Die FICI-Werte von Isobologrammen mit deutlichem Trend wurden gepoolt und die Konfidenzintervalle berechnet. Für die Endauswertung wurden die FICI-Werte aller Checkerboard-Assays mit identischen Ansätzen gepoolt, und die Konfidenzintervalle berechnet.

### 6.5.3.7 Randeffekte und Randpunkte

Messpunkte, die entweder auf der Horizontalen ( $A_k/1$ ) oder der Vertikalen ( $1/B_k$ ) liegen, die durch die MHK-Punkte der Koordinatenachsen verlaufen, werden als Randpunkte bezeichnet. Stets sind es Messpunkte, bei denen der eine Stoff in der MHK vorliegt (B bei  $A_k/1$ ) und der andere Stoff in Konzentrationen weit unterhalb seiner eigenen MHK ( $A_k < 1$ -MHK A). Es ist offensichtlich, dass bei diesen Punkten keine antagonistische Interaktion vorliegt, denn mit zunehmender Konzentration des niedriger dosierten Stoffes ( $A_k$ ) findet keine Veränderung der antimikrobiellen Aktivität des dominierenden Stoffes (B) statt. Rein rechnerisch bewegt sich der FICI-Wert jedoch in Richtung Antagonismus, obwohl keine antagonistische Interaktion stattfindet. Aus diesem Grund wurden diese Randpunkte nicht in die Berechnung der FICI-Werte mit einbezogen. Der Vollständigkeit halber wurden diese Punkte in den Isobologrammen belassen und als Kreise dargestellt.

Ähnliche Effekte können auch bei Konzentrationen unterhalb der MHK-Werte auftreten ( $A_k/B_{ki}$ ), die im Isobologramm als "Treppenstufen" erscheinen. Solche Messpunkte wurden in die Berechnungen aufgenommen (siehe: Zur Auswahl der Messpunkte).

### 6.5.3.8 Die Bedeutung der Mischungsverhältnisse

Identische Mischungsverhältnisse (Kombinationen) unterschiedlicher Konzentrationen liegen im Checkerboard-Assay auf Diagonalen (Mischungslinien) und im Isobologramm auf den Mischungsstrahlen, die im Nullpunkt (0/0) zusammenlaufen (Abb. 22). Kombinationseffekte sind sowohl von den Konzentrationen als auch vom Mischungsverhältnis der eingesetzten Stoffe abhängig. Verändert sich das Mischungsverhältnis, so kann sich unter Umständen auch die Effektstärke verändern und von einem synergistischen in einen antagonistischen Effekt umschlagen oder umgekehrt (Abb. 23).

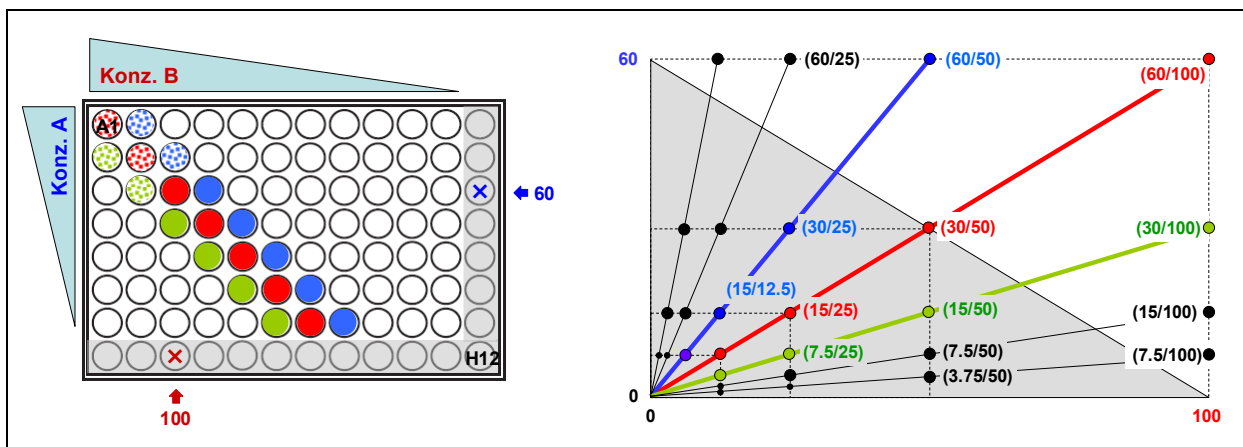


Abb. 22: Mischungslinien im Checkerboard-Assay und Mischungsstrahlen im Isobologramm.

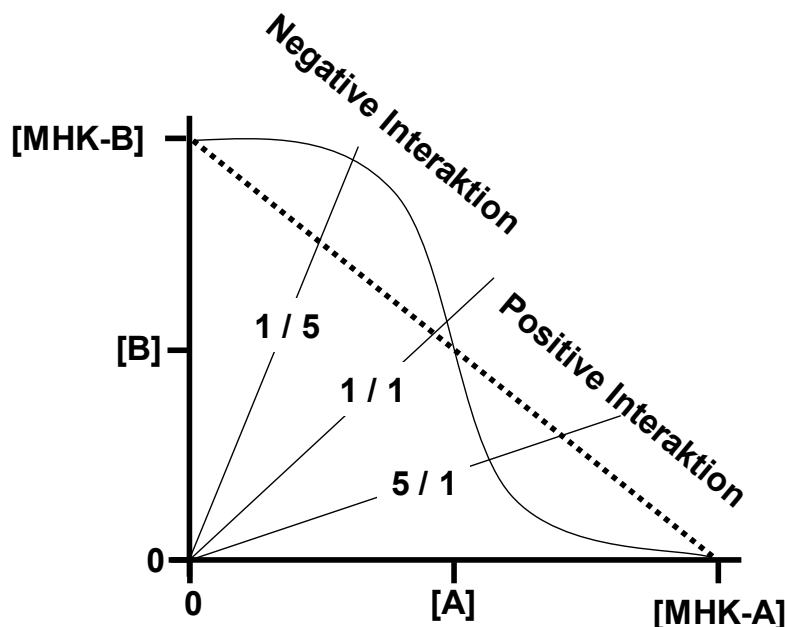
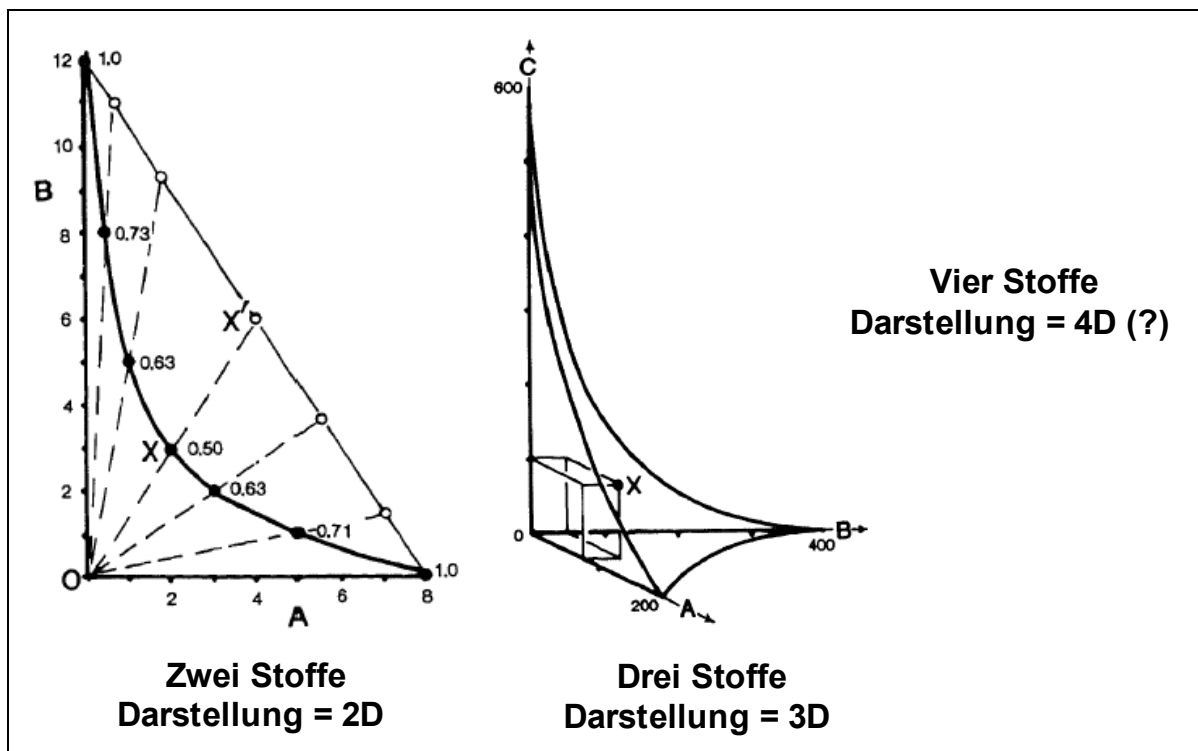


Abb. 23: Der Kurvenverlauf kann sich mit dem Mischungsverhältnis in seltenen Fällen auch qualitativ drastisch ändern.

### 6.5.3.9 Grenzen der Darstellung mittels Isobologrammen

Das Isobologramm ist als graphische Methode gut geeignet die Wechselwirkung zwischen zwei oder drei Inhaltsstoffen (als FICI-Werte) in zweidimensionaler bzw. dreidimensionaler Darstellung abzubilden. Bei mehr als drei Stoffen stösst diese Darstellungsweise jedoch an ihre Grenzen (Abb. 24). Die algebraische Methode zur Berechnung des FICI ist in dieser Hinsicht keinen Beschränkungen unterworfen. Für graphische Vergleiche von Kombinationen mit drei oder mehr Inhaltsstoffen wurden in dieser Arbeit stets Darstellungen der Time-Kill-Methode verwendet.

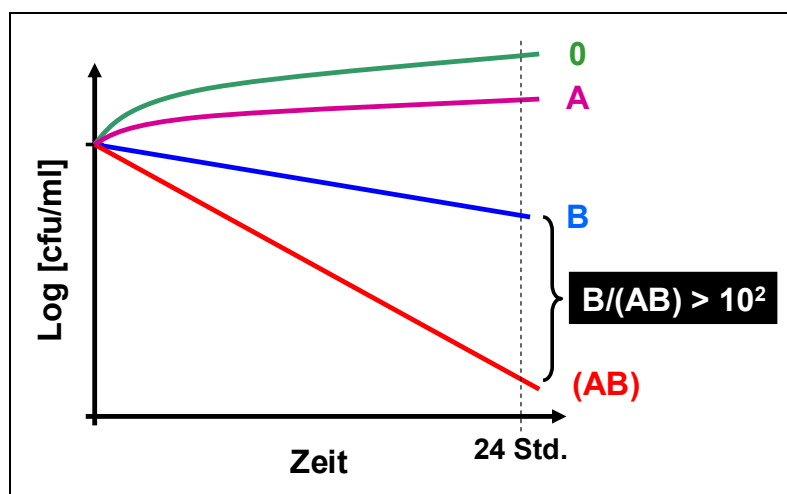


**Abb. 24:** Isobologramme für zwei und drei Stoffe in zweidimensionaler und dreidimensionaler Darstellungsweise. In der linken Darstellung (2D) sind neben den Messpunkten die FICI-Werte eingetragen. Bei mehr als drei Stoffen stösst die Darstellung mittels Isobologrammen an ihre Grenzen.



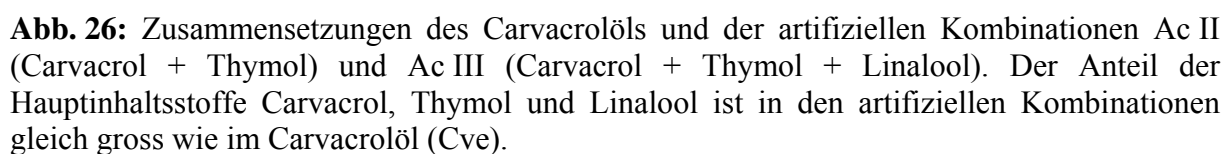
#### 6.5.4 Die Time-Kill-Methode

Durch die Erfassung der Keimdichte in definierten Zeitintervallen  $[\text{cfu/ml}]_t$  liefert die Time-Kill-Methode ein dynamisches Bild der antimikrobiellen Aktivität. Da die Wirkung der ätherischen Öle sehr schnell eintritt und die Absterberaten sehr hoch waren, wurden die ersten Intervalle so kurz wie möglich gewählt. Zu folgenden Zeitpunkten wurden Proben entnommen: nach 0, 15, 30, 60, 120, 240 und 360 Minuten sowie nach 24 Stunden. Die ersten beiden Intervalle betrugen 15 Minuten. Diese Zeit reichte gerade aus, um die Absterbekinetik von vier unterschiedlichen Ansätzen gleichzeitig zu erfassen (zwischen 15 und 30 Minuten). Der limitierten Zeit wegen, konnten die Null-Kontrolle und die Positivkontrolle (Gm) zum Zeitpunkt  $t_1 = 15$  Minuten nicht erfasst werden. Sie wurden übersprungen und bei  $t_2 = 30$  Minuten wieder gemessen. Die Ansätze wurden in verschliessbaren 1.5 ml Reaktionsgefässen durchgeführt und im Schüttelinkubator bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Zu den vorgesehenen Zeitpunkten wurde den Reaktionsgefässen jeweils ein Aliquot von  $50\ \mu\text{l}$  entnommen, um mit Hilfe einer Verdünnungsreihe ( $10^{-1}$  bis  $10^{-6}$ ) die Keimzahl zu bestimmen. Dazu wurde das Aliquot von  $50\ \mu\text{l}$  in Reaktionsgefässe mit  $450\ \mu\text{l}$  0.9% NaCl-Lösung gegeben. Von jeder Verdünnungsstufe wurde anschliessend drei Tropfen à  $20\ \mu\text{l}$  auf eine Müller-Hinton-Agarplatte gebracht, bei  $37^\circ\text{C}$  bebrütet und nach 24 Stunden die Kolonien (cfu) gezählt und als cfu/ml berechnet. Die Ansätze der Reaktionsgefässe wurden so wenig wie möglich variiert. Das Anfangsvolumen der Ansätze betrug stets  $1200\ \mu\text{l}$ . Mit Ausnahme des unverdünnten Inokulums ( $15\ \mu\text{l}$ ) enthielten alle Medien 0.5 % Agar. Synergistische Aktivität liegt bei der Time-Kill-Methode dann vor, wenn die Kombination nach 24 Stunden gegenüber der aktiveren der beiden Monosubstanzen eine 100-fache Reduktion der Keimdichte aufweist  $B/(AB) \geq 10^2$  [60].



**Abb. 25:** Bei der Time-Kill-Methode liegt Synergismus vor, wenn die Kombination nach 24 Stunden gegenüber der aktiveren der beiden Monosubstanzen eine 100-fache Reduktion der Keimdichte aufweist  $B/(AB) \geq 10^2$ .

Als artifizielle Kombinationen (Ac) wurden Mischungen aus den Monosubstanzen Carvacrol und Thymol (CT) bzw. Carvacrol, Thymol und Linalool (CTL) bezeichnet. Die Anteile der Monosubstanzen Carvacrol (C), Thymol (T) und Linalool (L) wurden so zusammengemischt, dass sie exakt den Konzentrationen entsprachen, wie sie im Carvacrolöl (Cve-batch 3) vorliegen (Abb. 26). So konnte die Wirksamkeit des natürlichen Vielstoffgemisches (Cve) direkt mit Kombinationen aus zwei (CT) bzw. drei (CTL) Hauptkomponenten verglichen werden. Auf diese Weise war es möglich, den Einfluss der restlichen Monoterpene des Vielstoffgemisches Carvacrolöl auf die antimikrobielle Aktivität zu messen.



### **6.5.5 Adaptationsversuche**

Die Adaptationsversuche wurden in 1.5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt und bei 37°C im Schüttelinkubator bebrütet. Beginnend mit 1-MHK bzw. 200 µg/ml Thymolöl des Chemotyps Carvacrol und einem McFarland Inokulum von ca. 10<sup>5</sup> cfu/ml, wurde den Reaktionsgefäßen alle zwei Stunden ein Aliquot von 50 µl entnommen und eine Verdünnungsreihe erstellt, um die Keimzahl zu bestimmen. Ein weiteres Aliquot von 10 µl wurde in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß übertragen, dass die nächst höhere Konzentration enthielt.

Die Wachstumsrate ( $\mu$ ), die im Zusammenhang mit dem Adaptationsvermögen untersucht wurde, wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\mu = (\ln x - \ln x_0) / \Delta t.$$

#### **6.5.5.1 Adaptationsvermögen und Wachstumsrate**

Zur Berechnung der Korrelation zwischen Adaptationsvermögen und Wachstumsrate, musste das Adaptationsvermögen in Zahlen gefasst werden. Dazu wurde eine einfache Rangliste der sechs Keime erstellt, die das Adaptationsvermögen repräsentierte. In Zweifelsfällen wurde die Rangliste mittels relativer Reduktion der Keimdichte bestimmt ( $x_n/x_0$ : wobei  $x_0$  = Inokulumdichte und  $x_n$  = Keimdichte bei höchster Konzentration).

## **6.6 Statistische Methoden**

### **6.6.1 MHK-Werte**

Bei den paarweisen Vergleichen der MHK-Mittelwerte der Mikroorganismen konnte eine Normalverteilung vorausgesetzt werden. Nachdem eine einfaktorielle Varianzanalyse zur Verwerfung von  $H_0$  geführt hatte, wurden mittels Newman-Keuls-Test paarweise Vergleiche durchgeführt. Bei den paarweisen Vergleichen der MHK-Mittelwerte des Carvacrolöls und der beiden Monosubstanzen Thymol und Carvacrol, gemessen als Mittelwert aller sechs untersuchten Mikroorganismen, konnte keine Normalverteilung vorausgesetzt werden. Die drei Gruppen wurden zuerst mit Hilfe der verteilungsfreien Friedman's Rangvarianzanalyse auf Unterschiede geprüft ( $H_0$  = alle Mediane gleich). Nachdem der Friedman-Test eine Verwerfung der Nullhypothese ergeben hat, wurden paarweise Vergleiche mittels Wilcoxon-Wilcox-Test für multiple Vergleiche durchgeführt [62].

### **6.6.2 Mittelwertsvergleich der Variationskoeffizienten (Vk)**

Die Streuungen der MHK-Werte des Carvacrol- und des Linaloolöls wurde mit Hilfe der Variationskoeffizienten miteinander verglichen. Da eine Normalverteilung nicht vorausgesetzt werden konnte, wurde der U-Test von Mann & Whitney verwendet.

### **6.6.3 MHK & Tween-80**

Um den Zusammenhang zwischen Tween-80-Konzentrationen und den MHK-Werten abzuschätzen, wurde der Korrelationskoeffizient der linearen Regressionsgerade bestimmt.

### **6.6.4 Konfidenzintervalle der FICI-Werte**

Für die statistische Auswertung der FICI-Werte wurden die Daten identischer Assays gepoolt. Die 95%-Konfidenzintervalle der gepoolten FICI-Werte wurden mit dem Grenzwert für Synergismus von  $FICI = 0.5$  verglichen ( $H_0: \mu_0 = 0.5$ ).

Bei den Sham-Assays wurden die Konfidenzintervalle der gepoolten FICI-Werten gegen den Erwartungswert für rein additive Effekte von  $FICI = 1$  getestet ( $H_0: \mu_0 = 1.0$ ) [63].

## 6.7 Nachweisgrenze & minimale Inokulumdichte

Bei der Bestimmung der Keimzahl cfu/ml wird in der Regel nur ein Aliquot des zu analysierenden Volumens verwendet. Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass diese Aliquot keinen Keim mehr enthält obwohl im Ausgangsvolumen noch Keime vorhanden sind. Es besteht also die Gefahr, die tatsächliche Keimzahl zu unterschätzen. Die Nachweisgrenze ist die Inokulumkonzentration (Keimzahl), die mit dem gewählten Aliquot und der betreffenden Fragestellung gerade noch eine Keimzahlbestimmung zulässt. Des Weiteren ist es wichtig, dass der Reaktionsansätze mit einer ausreichend hohen Keimdichte beimpft werden, damit auch nach Einwirkung der keimtötenden Substanzen die reduzierte Keimzahl bestimmt werden kann. Um die Nachweisgrenze und die minimale Keimdichte des Inokulum bestimmen zu können, muss von der minimalen Keimdichte des ausplattierten Aliquots (1 Keim/Aliquot) auf den Ansatz zurückgerechnet werden.

---

### Min. Inokulumdichte für Nachweisgrenze der MBK

---

Aliquot: 40 µl aus 200 µl well = 5

Ansatz: 100 µl MO in 200 µl well = 2

Übernachtskultur: 100 µl in 9.9 ml =  $10^2$

Signifikante Abnahme (MBK) =  $10^3$

---

cfu/ml minimal  $\Rightarrow 5 \times 2 \times 10^2 \times 10^3 = 1 \times 10^6$

---

---

### Min. Inokulumdichte zur Bestimmung der TKC

---

Aliquot: 60 µl aus 500 µl = 8,3

Ansatz: 50 µl aus 1200 µl = 24

Übernachtskultur / ml = 15 µl / 1200 µl = 80

Signifikante Abnahme (MHK) =  $10^2$

---

cfu/ml minimal  $\Rightarrow 8.3 \times 24 \times 80 \times 10^2 = 1.6 \times 10^6$

---

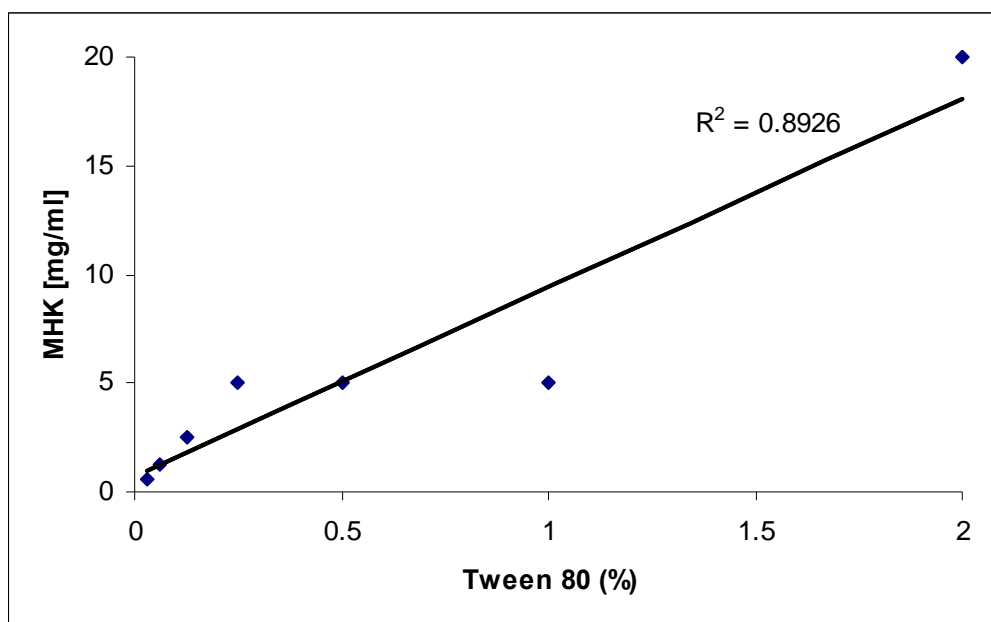
## 7 Etablierung der MHK und MBK Bestimmung

Obwohl die Methodik zur Bestimmung der MHK mittels Mikrotiterplatten als etabliert gilt, blieben in Zusammenhang mit der Verwendung der ätherischen Öle einige methodische Fragen offen. Es handelte sich bei um Fragen zur Löslichkeit und Stabilität der ätherischen Öle im wässrigen Medium, der Abhängigkeit von der Inokulumdichte und der optimalen Abdeckung der Mikrotiterplatten. In Vorversuchen wurden diese Fragen geklärt.

### 7.1 Löslichkeit

#### 7.1.1 Agar und Tween-80 im Vergleich

Ätherische Öle sind auf Grund ihres ausgesprochen lipophilen Charakters in wässrigen Medien in der Regel schlecht löslich. Um die Löslichkeit lipophiler Verbindungen in wässrigen Medien zu erhöhen, werden meistens Detergentien als Emulgatoren zugegeben. Der Einsatz von Detergentien wie Tween-80 hat jedoch verschiedene Nachteile. Detergentien können das Wachstumsverhalten der Mikroorganismen nachteilig beeinflussen, und dadurch den Effekt der ätherischen Öle verfälschen. Ab einer gewissen Konzentration bilden Detergenzien zudem Micellen, die dazu neigen andere lipophile Verbindungen wie ätherische Öle in sich aufzunehmen, wodurch die wirksame Konzentration des ätherischen Öls im Medium abnimmt. In der neueren Literatur werden zunehmend Methoden beschrieben, die an Stelle von Lösungsmitteln Dispersionsmittel wie Agar oder Carrageenan verwenden [64-67]. Um abzuklären, ob Agar für die geplanten Experimente als Dispersionsmittel geeignet wäre, wurde die Anwendung von Tween-80 und Agar miteinander verglichen. In Abwesenheit von Thymianöl blieb das Wachstum von *Staphylococcus aureus* bis zu einer Konzentration von 2% Tween-80 unbeeinflusst. Wurden Thymianöl und Tween-80 jedoch gleichzeitig ins Medium eingebracht, verringerte sich mit zunehmender Konzentration von Tween-80 die antimikrobielle Wirkung des Thymianöls (Abb. 27). Mit zunehmender Tween-80 Konzentration verstärkt sich die Neigung von Tween-80 Micellen zu bilden, die andere lipophile Stoffe wie ätherische Öle in sich aufnehmen, wodurch die Konzentration des molekular gelösten ätherischen Öls abnimmt und damit auch die antibakterielle Wirkung.



**Abb. 27:** Darstellung der MHK in Abhängigkeit der Tween-80 Konzentration (Chemotyp = Thymol; MO = Staph. aureus).

Mit Agar als Dispersionsmittel in einer Endkonzentration von 0,05% konnten im Vergleich zu Tween-80 als Emulgator (0,05%) bessere Resultate erzielt werden (Tab. 9). Deshalb wurden die weiteren Untersuchungen mit 0,05% Agar (Endkonzentration) als Dispersionsmittel durchgeführt.

Lösungs- bzw. Dispersionsmittel	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]				
	Ste	Sta	Sap	KI	Ca
Tween 0.05% konst.	781	468	625	390	625
Tween 0.05% abn.	625	<b>234</b>	313	<b>156</b>	<b>156</b>
Agar 0.05% konst.	<b>260</b>	391	<b>260</b>	<b>156</b>	<b>156</b>
Agar 0.025% konst.	365	273	<b>260</b>	208	208

**Tab. 9:** Vergleich der MHK-Werte bei Verwendung von Tween-80 und Agar als Emulgator bzw. Dispersionsmittel. Mit Agar als Dispersionsmittel lassen sich tendenziell tiefere MHK-Werte erzielen.

### 7.1.2 Mischverfahren im Vergleich

Eine weitere Frage zur Optimierung der Löslichkeit betraf die Art und Weise des Mischvorganges. Ziel des Mischvorganges ist eine möglichst feine und homogene Verteilung des ätherischen Öls im agarhaltigen Medium. Als Medium diente Müller-Hinten-Broth mit 0,1% Agar (Endkonzentration im

Versuchsansatz = 0.05% Agar). Es standen drei verschiedene, gut praktikierbare Methoden zur Verfügung. Ein Mixer, ein Vortex-Gerät und das Schütteln von Hand. Bereits kurzes Schütteln der Mischung reichte aus, um einen maximalen Effekt zu erzielen. Durch Mixen mit unterschiedlich hohen Drehzahlen liess sich die antimikrobielle Aktivität nicht weiter steigern. Die maximale Löslichkeit von Thymol und Linalool in wässrigem Medium wird offensichtlich schnell erreicht und lässt sich mit mechanischen Verfahren nicht steigern.

Die Minimalen Hemmkonzentrationen des Chemotyps Thymol lagen bei allen untersuchten Keimen unterhalb der maximal löslichen Konzentration von Thymol in Wasser (1000 mg/l). Der höchste MHK-Wert lag bei 600 µg/ml. Beim Chemotyp Linalool dagegen überstieg der höchste MHK-Wert mit 5000 µg/ml die maximale Löslichkeit von Linalool in wässrigem Medium (1500mg/l). Es gilt hier jedoch zu berücksichtigen, dass die Inkubationstemperatur 37°C betrug und das ätherische Öl als Vielstoffgemisch möglicherweise Komponenten enthält, die als Lösungsvermittler wirken. Nicht zuletzt dürften sich auch die 0.05% Agar als Dispersionsmittel positiv auswirken. Die Konsistenz der Resultate deutet darauf hin, dass die entsprechende Linalool-Konzentration tatsächlich erreicht wird und stabil ist.

Thymol (je 30 Sek.)	MHK [µg/ml]					
	Ste	Sta	Sap	KI	Ec	Ca
24'000 rpm	625	312	312	156	312	312
19'000 rpm	625	312	312	<b>312</b>	<b>468</b>	312
13'000 rpm	625	312	312	<b>468</b>	<b>625</b>	312
shaken	625	312	312	156	312	312
vortexed	625	312	312	156	312	312
cfu/ml	4.3x10 <sup>6</sup>	3.3x10 <sup>6</sup>	6x10 <sup>5</sup>	4.2x10 <sup>6</sup>	1.4x10 <sup>7</sup>	1.5x10 <sup>3</sup>

**Tab. 10:** Einfluss unterschiedlicher Mischvorgänge und Mischintensitäten auf die MHK-Werte von Carvacrolöl.

Linalool (je 30 Sek.)	MHK [µg/ml]					
	Ste	Sta	Sap	KI	Ec	Ca
24'000 rpm	5000	1250	1250	625	1250	1250
19'000 rpm	5000	1250	1250	<b>312</b>	1250	1250
13'000 rpm	5000	1250	1250	625	1250	1250
shaken	5000	625	1250	625	1250	1250
vortexed	5000	1250	1250	625	1250	1250
cfu/ml	3.3x10 <sup>6</sup>	3.8x10 <sup>6</sup>	7x10 <sup>5</sup>	5.3x10 <sup>6</sup>	1.2x10 <sup>7</sup>	1.2x10 <sup>5</sup>

**Tab. 11:** Einfluss unterschiedlicher Mischvorgänge und Mischintensitäten auf die MHK-Werte von Linaloolöl.



## 7.2 Inokulumeffekte

Die Methode nach McFarland ist ein einfaches und etabliertes Verfahren, um eine mehr oder weniger konstante Inokulumdichte von ca.  $10^5$  cfu/ml zu erhalten [60]. Eine gewisse Streuung des Inokulums ist jedoch unvermeidlich. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Inokulumdichte auf die MHK untersucht. Dazu wurde von den Übernachtskulturen drei Verdünnungsstufen erstellt:  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  und  $10^{-5}$ , wobei die erste Verdünnungsstufe dem McFarland Inokulum von ca.  $10^5$  cfu/ml entsprach. *Staphylococcus aureus* war der einzige Keim, dessen MHK in Anwesenheit von Thymolöl einen deutlichen Zusammenhang zur Inokulumdichte aufwies (Tab. 12). In Gegenwart des Linaloolöls traten keine Inokulumeffekte auf (Tab. 13).

Cve Inokulum	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]					
	Ste	Sta	Sap	KI	Ec	Ca
$\times 10^{-1}$	312	<b>312</b>	312	156	312	156
$\times 10^{-3}$	312	<b>156</b>	156	156	312	156
$\times 10^{-5}$	312	<b>78</b>	156	156	312	78
* [cfu/ml]	$4.2 \times 10^6$	$9.8 \times 10^6$	$8.8 \times 10^5$	$1 \times 10^7$	$5.7 \times 10^6$	$9.9 \times 10^5$

Cve Inokulum	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]					
	Ste	Sta	Sap	KI	Ec	Ca
$\times 10^{-1}$	312	<b>312</b>	312	156	312	156
$\times 10^{-3}$	312	<b>156</b>	156	156	312	156
$\times 10^{-5}$	312	<b>78</b>	156	156	312	78
* [cfu/ml]	$3.8 \times 10^7$	$2.8 \times 10^7$	$5.3 \times 10^7$	$6.8 \times 10^7$	$1 \times 10^8$	$6.6 \times 10^5$

Cve Inokulum	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]					
	Ste	Sta	Sap	KI	Ec	Ca
$\times 10^{-1}$	500	<b>250</b>	250	250	750	250
$\times 10^{-3}$	500	<b>125</b>	250	250	375	250
$\times 10^{-5}$	500	<b>46</b>	250	250	250	125
* [cfu/ml]	$3 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$4 \times 10^7$	-

**Tab. 12:** Abhängigkeit der MHK von der Inokulumdichte. *Staphylococcus aureus* war der einzige Keim, dessen MHK in Gegenwart des Chemotyps Thymol mit der Inokulumdichte abnahm.

Loe Inokulum	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]					
	Ste	Sta	Sap	Kl	Ec	Ca
$\times 10^{-1}$	2500	1250	625	625	1250	625
$\times 10^{-3}$	3750	625	625	625	1250	625
$\times 10^{-5}$	3750	625	1250	9375	1250	9375
* [cfu/ml]	$3 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$4 \times 10^7$	-

**Tab. 13:** Abhängigkeit der MHK von der Inokulumdichte. In Gegenwart des Chemotyps Linalool konnte keine Abhängigkeit von der Inokulumdichte festgestellt werden.

### 7.3 Abdeckfolien

Ätherische Öle sind leicht flüchtige Substanzen. Es stellte sich deshalb die Frage, ob die dazugehörigen Deckel der Mikrotiterplatten einen ausreichend dichten Verschluss darstellen, oder ob andere Abdeckmöglichkeiten vorzuziehen wären. Aus diesem Grund wurden Versuche mit einer Klebfolie und mit Parafilm an Stelle des Deckels durchgeführt. Am schlechtesten schnitt die Klebfolie ab. Möglicherweise hatte der Klebstoff eine gewisse Affinität zu den ätherischen Ölen, denn an der Innenseite der Folien bildeten sich stets kleine Tröpfchen, die wahrscheinlich ätherisches Öl enthielten. Die Abdeckung mittels Parafilm führte ebenfalls zu schlechteren MHK-Werten als mit dem Deckel (Tab. 14). Auch hier war die Innenseite mit kleinen Tröpfchen beschlagen. Die Unterschiede lagen zwar im Streubereich der zu erwartenden Abweichungen, mit den dazugehörigen Deckeln traten jedoch tendenziell besser MHK-Werte auf.

Parafilm						
Cve	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]					
	Ste	Sta	Sap	Kl	Ca	
mit Deckel	312	78	156	156	156	
mit Parafilm	625	156	312	468	156	

Loe	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]					
	Ste	Sta	Sap	Kl	Ca	
mit Deckel	> 5000	2500	2500	625	625	
mit Parafilm	> 5000	2500	2500	1250	1250	

## Klebfolie

Cve	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]				
	Ste	Sta	Sap	KI	Ca
mit Deckel	312	156	312	312	156
mit Folie	1250	625	625	625	312

Loe	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]				
	Ste	Sta	Sap	KI	Ca
mit Deckel	5000	1250	2500	625	625
mit Folie	5000	5000	5000	2500	1250

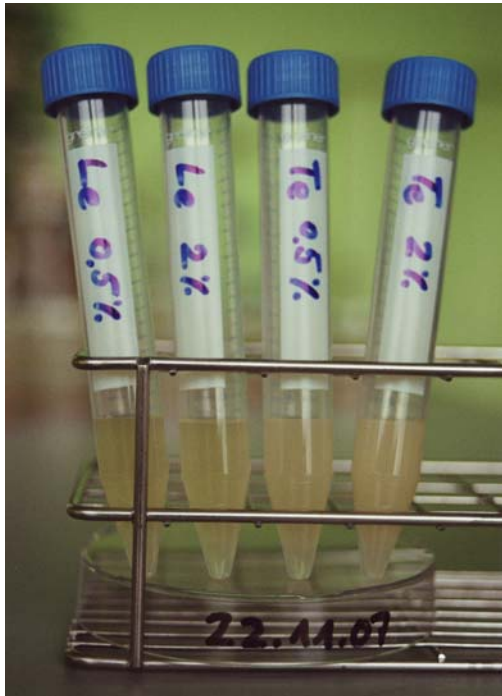
**Tab. 14:** Obwohl die Deckel wahrscheinlich nicht absolut dicht verschliessen, fallen die MHK-Werte mit Deckeln tendenziell besser aus als mit vollständig abdichtender Klebfolie oder Parafilm.

## 7.4 Stabilität der ätherischen Öle

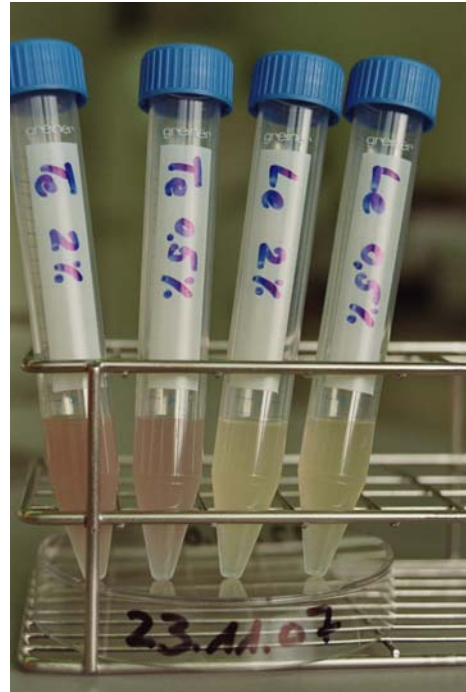
Ätherische Öle sind in ihrer hochkonzentrierten Form in der Regel gut haltbar. Die antimikrobielle Aktivität von zwei Thymianölen (Farfalla), deren Kauf ein Jahr auseinander lag (Juni 2006 und Juni 2007), wurde miteinander verglichen. Das ätherische Öl (2006) wurde während einem Jahr bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Bei keinem der sechs untersuchten Keime konnte eine Abnahme der MHK festgestellt werden. Thymianöl des Chemotyps Thymol (in 0.1% Agar), das 24 Stunden dem Tageslicht ausgesetzt war, verfärbt sich bläulich (Abb. 28 & 29). Die Verfärbung beeinträchtigte die MHK nicht (F2-24h).

äth. Öl	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]					
	Ste	Sta	Sap	KI	Ec	Ca
Cve: 2006	312	156	312	156	312	156
Cve: 2007	312	156	312	156	312	156
Cve: 2007-24h	312	156	312	156	312	156
The BA	312	156	312	156	312	156

**Tab. 15:** Vergleich unterschiedlicher Batches des Thymianöls von Farfalla. Batch 2 Farfalla Juni 2006 (F1); Batch 3 Farfalla Juni 2007 (F2); Thymianöl der Berg-Apotheke Juni 2007 (BA). Nach 24 Std. am Licht ist der Thymoltyp **verfärbt!**



**Abb. 28:** Frisch hergestellte Verdünungen des Linalool- und "Thymoltyps" in 0.1% MH-Agar.



**Abb. 29:** Nach einem Tag am Tageslicht hat sich der "Thymoltyp" verfärbt.

## 8 Resultate

### 8.1 Zur Analytik der Farfalla Öle

Farfalla bietet drei Thymianöle an, die alle aus kontrolliert biologischem Anbau stammen. Es handelt sich dabei um einen Thymoltyp, einen Linalooltyp und einen Bergthymian der ebenfalls als Linalooltyp deklariert ist. Der Thymoltyp wird in Italien produziert, die beiden Linalooltypen in Frankreich. Das Inhaltsspektrum des Linaloolöls entspricht weitgehend der Zusammensetzung eines reinen Linaloolchemotypen [52]. Das Thymolöl dagegen weicht stark vom reinen Thymolchemotypen ab. Das dominierende Monoterpen ist nicht Thymol, sondern Carvacrol, das mit einem Anteil von 36% in batch 2 bzw. 49% in batch 3 vertreten ist. Thompson (Thompson et al. 2003) untersuchte in Frankreich verschiedene Chemotypen und fand Thymoltypen mit einem maximalen Gehalt an Carvacrol von 26.8% und Carvacroltypen mit einem maximalen Gehalt an Thymol von 18.2%. Dass das Material von einem reinen Thymoltyp oder Carvacroltyp stammt, kann praktisch ausgeschlossen werden, da entweder die Thymolkonzentration oder die Carvacrolkonzentration zu hoch ist. Das gleichzeitige Auftreten der hohen Thymol- und Carvacrolkonzentration deutet darauf hin, dass das Öl aus einer Mischung der beiden Chemotypen hergestellt wurde. Die Zusammensetzung der Öle, die in zwei aufeinander folgenden Jahren erworben wurden, war jedoch vergleichbar, wie die Gc-Analyse zeigt. Unter Verwendung der Durchschnittswerte der stofflichen Zusammensetzung der reinen Chemotypen, lässt sich eine grobe Abschätzung der Anteile an Chemotypen vornehmen, die zur Herstellung des Öls verwendet wurden. Unter Berücksichtigung der drei häufigsten Chemotypen Thymol, Carvacrol und Linalool ergibt sich folgende Abschätzung:

	Abschätzung der Chemotypenanteile in %		
	Thymol	Carvacrol	Linalool
<b>Batch 1</b>	<b>23</b>	<b>76</b>	<b>1</b>
<b>Batch 2</b>	<b>29</b>	<b>68</b>	<b>3</b>

**Tab. 16:** Eine grobe Abschätzung der mengenmässigen Anteile der drei häufigsten Chemotypen, die zur Herstellung des Farfallaöls des Chemotyps "Thymol" verwendet wurden, lässt sich mit Hilfe der Durchschnittswerte errechnen (Quelle: Thompson et al. 2003 [52]).

Da der Chemotyp von der mengenmässig am stärksten vertretenen Komponente bestimmt wird, müsste der "Thymoltyp" von Farfalla eigentlich als Carvacroltyp bezeichnet werden. Auch im Ausgangsmaterial muss der Chemotyp Carvacrol dominiert haben, wie die Abschätzung der mengenmässigen Anteile zeigt.

## 8.2 Die MHK der ätherischen Öle

Im Gegensatz zu den beiden Antibiotika Ampicillin und Gentamycin, deren antimikrobielle Aktivität sich auf bestimmte Bakterien beschränkt, zeigte das Vielstoffgemisch Thymianöl und seine aktiven Monosubstanzen Carvacrol, Thymol und Linalool bei allen fünf untersuchten Bakterienstämmen und beim Hefepilz *Candida albicans* antimikrobielle Wirkung (Tab. 17).

Mikroorganismen	MHK-Werte in [µg/ml]					
	Ste	Sta	Sap	Kl	Ec	Ca
<b>Antibiotika:</b>						
Ampicillin (Amp)	12.42	0.10	0.27	R	6.25	–
Gentamycin (Gm)	0.03	0.41	0.03	0.32	1.90	–
<b>Thymianöle:</b>						
Carvacrol (Cve)	406	200	296	175	344	199
Linalool (Loe)	3884	1791	2885	977	1688	1696
<b>Monosubstanzen:</b>						
Carvacrol (Cvm)	479	375	391	269	391	227
Thymol (Thm)	675	388	450	210	488	233
Linalool (Lom)	4625	2450	1950	825	1650	1800

**Tab. 17:** MHK-Werte der Antibiotika (Amp, Gm), der Thymianöle (Cve, Loe) und den Hauptwirkstoffen als Monosubstanzen (Cvm, Thm, Lom)

Die MHK-Werte des Thymianöls (Chemotyp Carvacrol) sind im Vergleich zu den MHK-Werten der beiden Antibiotika Ampicillin und Gentamycin um das 30 bis 13'500-fache grösser, obwohl das Carvacrolöl zu den am stärksten antimikrobiell wirkenden ätherischen Ölen zählt. Die MHK-Werte, die erforderlich waren um den empfindlichsten und den widerstandsfähigsten der untersuchten Keime zu hemmen, unterschieden sich bei den Antibiotika wesentlich stärker als bei den ätherischen Ölen (Tab. 18). Im Allgemeinen wird dies der spezifischen Wirkung der Antibiotika zugeschrieben. Für *Staph. epidermidis*, den widerstandsfähigsten der fünf Keime gegenüber Ampicillin, ist im Vergleich zu *Staph. aureus*, dem empfindlichsten Keim, eine 124-fache Konzentration Ampicillin erforderlich, um die MHK zu erreichen. Bei Gentamycin dagegen ist *Staph. epidermidis* der empfindlichste Keim und für *E. coli*, den robustesten Keim, ist die 63-fache Konzentration Gentamycin erforderlich. Beim Chemotyp Carvacrol reicht etwas mehr als die doppelte Konzentration der MHK, die für den empfindlichsten Keim erforderlich ist, aus, um auch den widerstandsfähigsten der sechs Keime zu hemmen. Beim

Linaloolöl reicht die vierfache Konzentration des empfindlichsten Keimes aus, um den robustesten Keim zu hemmen.

<b>Antibiotikum bzw. Ätherisches Öl</b>	<b>MHK [<math>\mu\text{g/ml}</math>] (max. – min.)</b>	<b>Quotient (max. / min.)</b>
Ampicillin	12.4 – 0.1	124
Gentamycin	1.9 – 0.03	63
Carvacrol-Typ	406 – 175	2
Linalool-Typ	3884 – 977	4

**Tab. 18:** Spannbreite der MHK-Werte für die sechs untersuchten Mikroorganismen und den Quotienten der jeweiligen Extremwerte.

Da das Linaloolöl eine etwa 10mal schwächere antimikrobielle Wirkung hatte als das Carvacrolöl und deshalb höher dosiert werden musste, fielen sowohl die MHK-Werte als auch die Standardabweichungen beim Linaloolöl entsprechend grösser aus. Um abzuklären, ob die grösseren Streuungen beim Linaloolöl tatsächlich mit der proportionalen Zunahme der höheren Konzentration erklärt werden kann, wurden die Mediane der Variationskoeffizienten miteinander verglichen. Der U-Test zeigt, dass sich die Mediane der Variationskoeffizienten statistisch nicht signifikant unterscheiden ( $\alpha=0.05$ ; zweiseitig). Die grösseren Streuungen der MHK-Werte beim Linaloolöl lassen sich durch die etwa 10-fach höhere Konzentration erklären.

<b>Äth. Öle</b>	<b>Variationskoeffizienten (<math>V_k</math> in %)</b>						<b>Median</b>
	<b>Ste</b>	<b>Sta</b>	<b>Sap</b>	<b>Kl</b>	<b>Ec</b>	<b>Ca</b>	
<b><math>V_k</math>-Cve</b>	40	43	19	31	29	49	<b>35.5</b>
<b><math>V_k</math>-Loe</b>	49	38	46	63	39	50	<b>47.5</b>

**Tab. 19:** Der U-Test zeigt, dass sich die Mediane der Variationskoeffizienten statistisch nicht signifikant unterscheiden ( $\alpha = 0.05$ ; zweiseitig).

Ab Konzentrationen von über 1% ( $> 10'000 \mu\text{g/ml}$ ) Linaloolöl bzw. Linaloolmonosubstanz traten mitunter optische Veränderungen (Schleierbildungen) im Agar-Medium auf. Eine 1%-ige Konzentration des Linaloolöls entspricht etwa der zehnfachen Konzentration der maximalen Löslichkeit des Linaloolöls.

Ein Vergleich der Abbildungen 30 und 31 zeigt, dass die Aktivitätsmuster des Carvacrol- und Linaloolöls gut übereinstimmen. Um *Staphylokokkus epidermidis* im Wachstum zu hemmen, werden die höchsten, für *Klebsiella pneumoniae* die kleinsten Konzentrationen an ätherischem Öl benötigt. Sowohl beim Carvacroltyp als auch beim Linalooltyp wird bereits mit einer

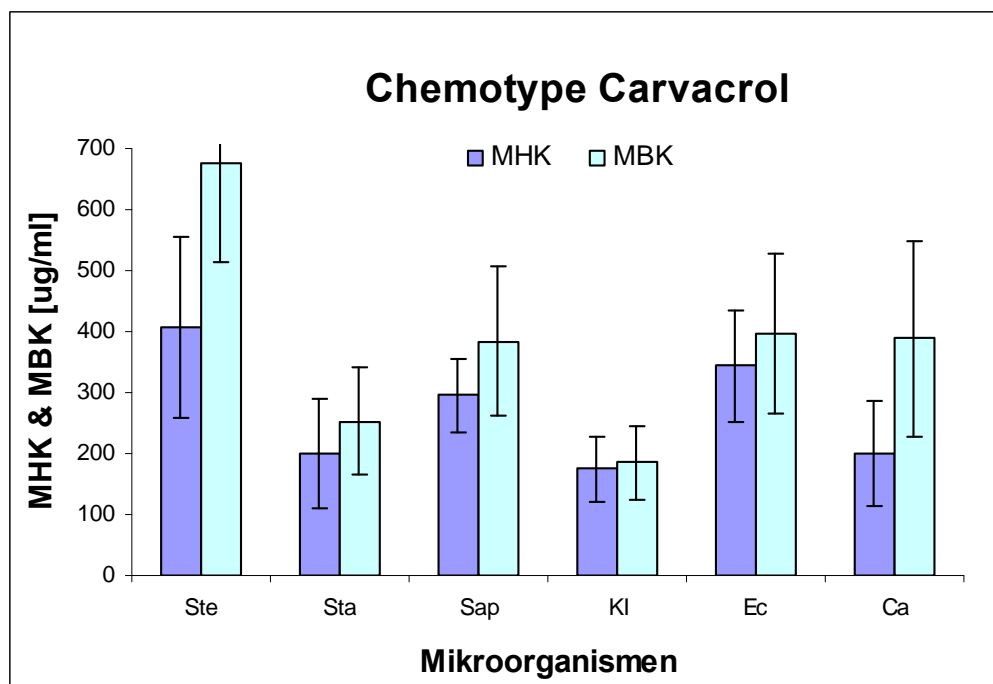
Verdoppelung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) die bakterizide Konzentration (MBK) erreicht.

Vergleicht man die MHK-Werte des Carvacrolöls mit den beiden Monosubstanzen Carvacrol (Abb. 34) und Thymol (Abb. 33), und die beiden Monosubstanzen miteinander (Abb. 32), so findet man keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Monosubstanz Carvacrol wirkt tendenziell etwas stärker antimikrobiell als die Monosubstanz Thymol. Das Carvacrolöl wirkt etwas stärker als die beiden Monosubstanzen Carvacrol und Thymol.

Die antimikrobielle Wirkung der Monosubstanz Carvacrol war bei allen Keimen mit Ausnahme von Klebsiella tendenziell stärker als die der Monosubstanz Thymol (Abb. 32). Die Unterschiede waren jedoch bei keinem der Keime signifikant (zweiseitiger t-Test unabhängiger Stichproben;  $\alpha = 0.05\%$ ).

Die antimikrobielle Aktivität des Carvacrolöls war bei allen sechs untersuchten Keimen grösser als der Monosubstanz Thymol (Abb. 33). Die Unterschiede waren jedoch bei keinem der Keime signifikant (zweiseitiger t-Test unabhängiger Stichproben;  $\alpha = 0.05\%$ ).

Weniger deutlich war die antimikrobielle Überlegenheit des Carvacrolöls verglichen mit der Monosubstanz Carvacrol. Bei Ca waren die Mittelwerte identisch, bei Ec schnitt die Monosubstanz tendenziell besser ab (Abb. 34). Die Unterschiede waren jedoch bei keinem der Keime signifikant (zweiseitiger t-Test unabhängiger Stichproben;  $\alpha = 0.05\%$ ).



**Abb. 30:** Durchschnittswerte und Standardabweichungen der MHK- und MBK-Werte für Thymianöl des Chemotyps Carvacrol (Cve).



### 8.2.1 Paarweiser Vergleich der MHK-Mittelwerte

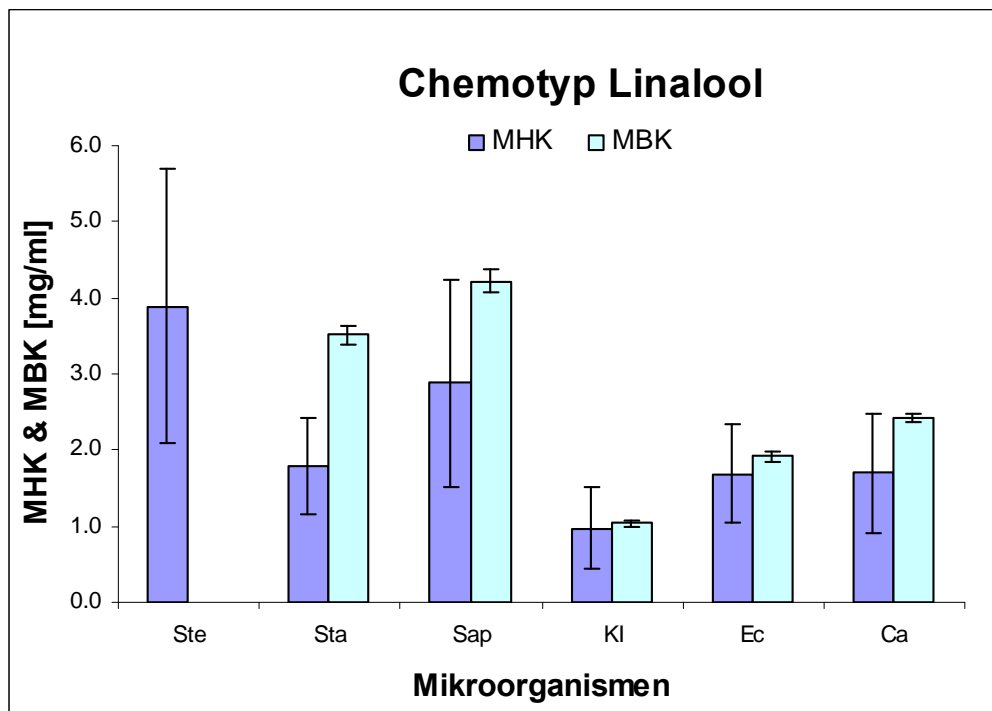
Nachdem die Varianzanalyse eine Verwerfung von  $H_0$  ( $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$ ) ergeben hatte, wurden die MHK-Werte mit dem Neuman-Keuls Test paarweise verglichen ( $H_0: \mu_m = \mu_n$  und  $H_1: \mu_m \neq \mu_n$ ). Es lassen sich zwei Gruppen bilden: Eine Gruppe mit tiefen MHK-Werten (Sta und KI) und eine Gruppe mit hohen MHK-Werten (Ste, Sap und Ec). Innerhalb der Gruppen lassen sich keine Mittelwertsunterschiede feststellen, zwischen den Gruppen gibt es Mittelwertsunterschiede. Ein Muster, das sich auch beim Linaloolöl und den Monosubstanzen wiederholt.

	<b>Ec</b>	<b>Sap</b>	<b>Sta</b>	<b>KI</b>
<b>Ste</b>	Ste - Ec	Ste - Sap	Ste - Sta	Ste - KI
<b>Ec</b>		Ec - Sap	Ec - Sta	Ec - KI
<b>Sap</b>			Sap - Sta	Sap - KI
<b>Sta</b>				Sta - KI

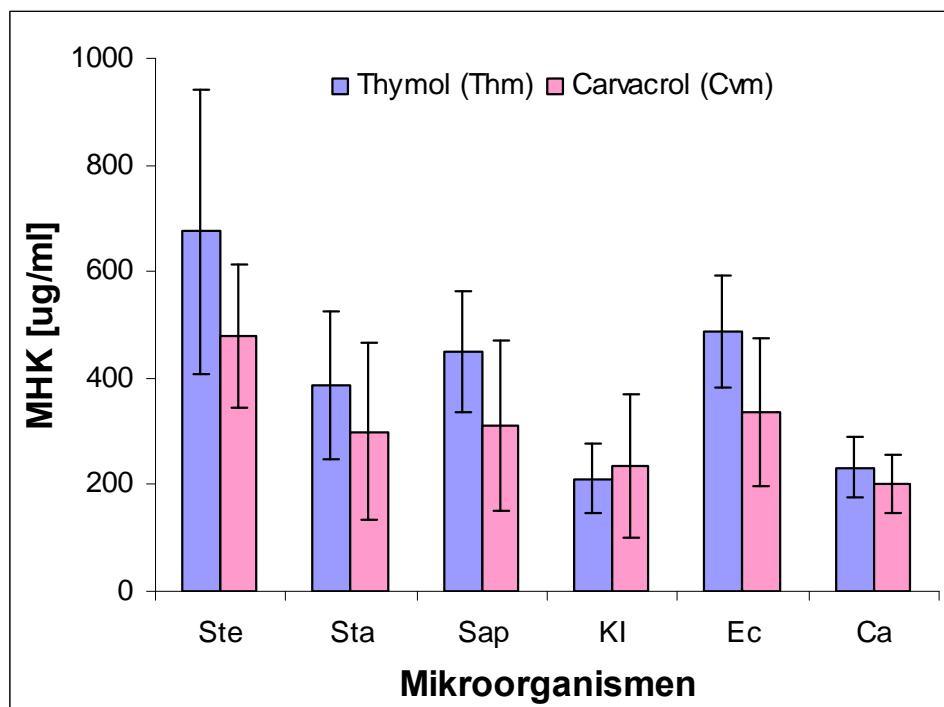


	<b>Ec</b>	<b>Sap</b>	<b>Sta</b>	<b>KI</b>
<b>Ste</b>	62 <i>n.s.</i>	110 ( <i>n.s.</i> )	206 *	231 *
<b>Ec</b>		48 <i>n.s.</i>	144 *	169 *
<b>Sap</b>			96 *	121 *
<b>Sta</b>				25 <i>n.s.</i>

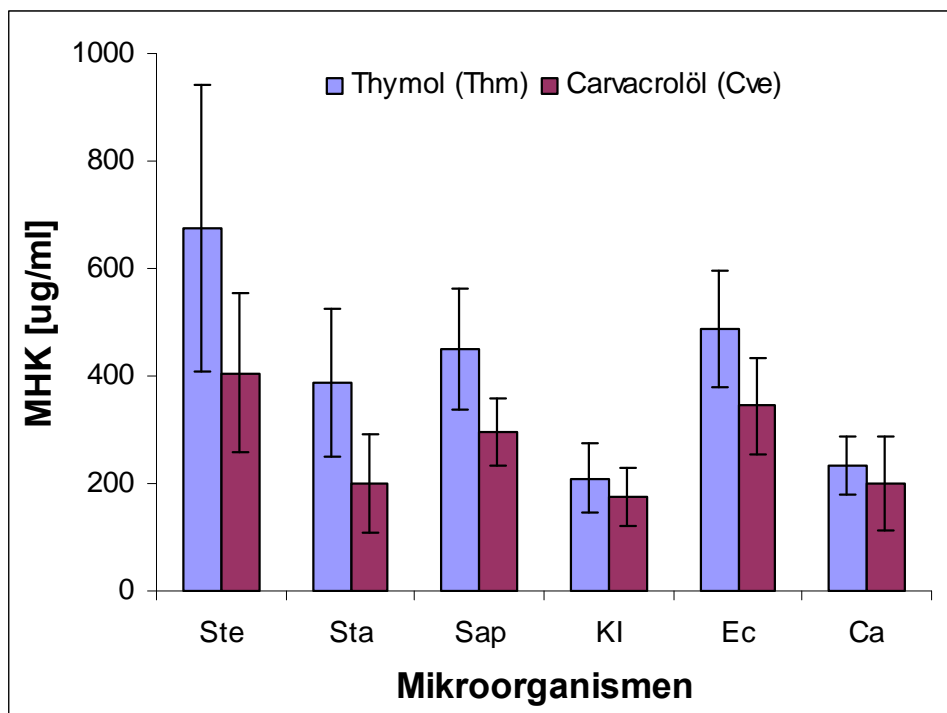
**Tab. 20:** Nachdem die Varianzanalyse eine Verwerfung von  $H_0$  ( $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$ ) ergeben hatte, wurden die MHK-Werte mit dem Neuman-Keuls Test paarweise verglichen (*n.s.* =  $H_0$ ; \* =  $H_1$ ;  $\alpha = 0.05$ ). (*n.s.*) = Testwert und Tabellenwert fallen zusammen.



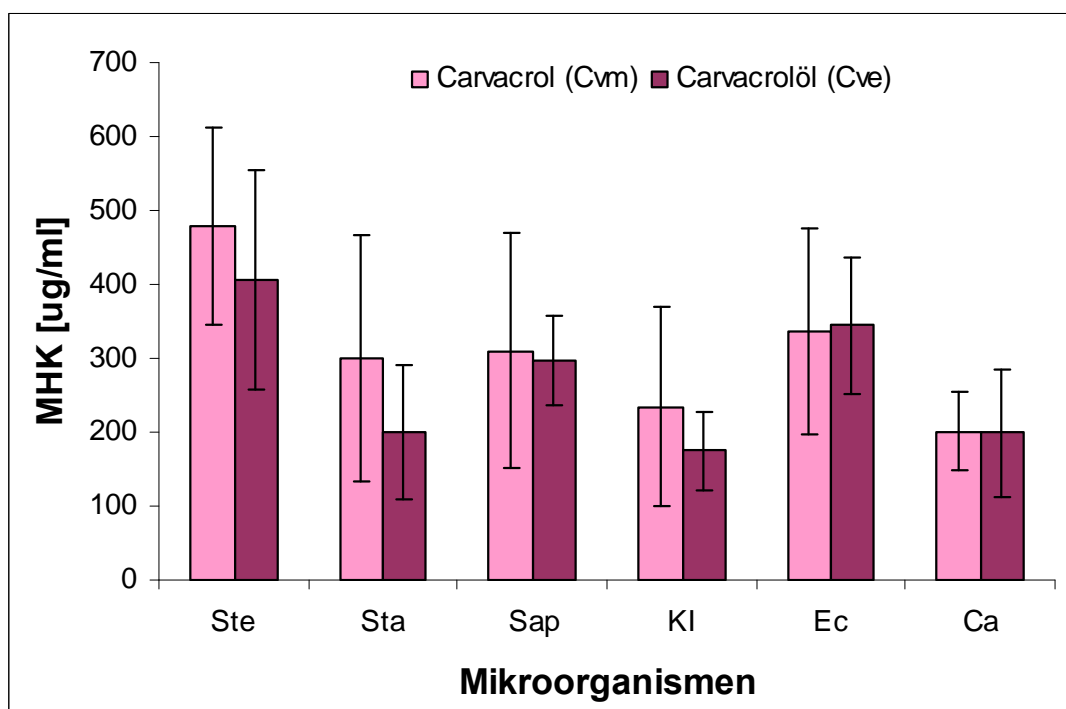
**Abb. 31:** Durchschnittswerte und Standardabweichungen der MHK- und MBK-Werte für Thymianöl des Chemotyps Linalool (Loe).



**Abb. 32:** Die MHK-Werte der beiden Monosubstanzen Thm und Cvm unterscheiden sich nicht signifikant. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen.



**Abb. 33:** Die MHK-Werte des Carvacrolöls unterscheiden sich nicht signifikant von den MHK-Werten der Monosubstanz Thymol. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen.



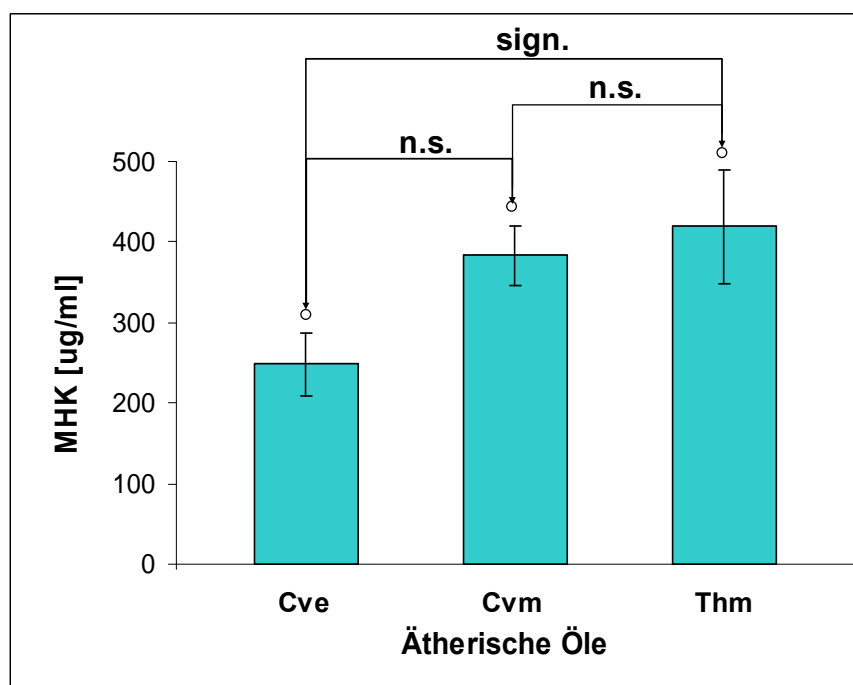
**Abb. 34:** Die MHK-Werte der Monosubstanz Carvacrol (Cvm) unterscheiden sich nicht signifikant von den MHK-Werten des Carvacrolöls. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen.

### 8.2.2 Zusammenfassung der MHK-Werte

Fasst man die MHK-Mittelwerte der ätherischen Öle Cve, Cvm und Thm für alle sechs untersuchten Keime als Mediane zusammen, so zeigt die Friedman-Rangvarianzanalyse für verteilungsfreie verbundene Daten, dass sich nur der MHK-Median des Carvacrolöls statistisch signifikant von der Monosubstanz Thymol unterscheidet (Abb. 35).

MO	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]				
	Cve	Cvm	Thm	Loe	Lom
<b>Ste</b>	406	479	675	3884	4630
<b>Sta</b>	200	375	388	1832	2310
<b>Sap</b>	296	391	450	2955	1690
<b>Kl</b>	175	269	210	983	840
<b>Ec</b>	344	391	488	1563	1690
<b>Ca</b>	199	227	233	1563	1690
<b>Median</b>	<b>248</b>	<b>383</b>	<b>419</b>	<b>2130</b>	<b>2142</b>
<b>Sterr.</b>	<b>38</b>	<b>37</b>	<b>71</b>	<b>1077</b>	<b>1306</b>

**Tab. 21:** Median und Standardfehler der MHK-Mittelwerte der ätherischen Öle (Cve & Loe) und der Monosubstanzen(Cvm, Thm & Lom).



**Abb. 35:** Nachdem die Friedman-Rangvarianzanalyse eine Verwerfung der Nullhypothese ergeben hat, wurde mit dem Wilcoxon-Wilcox-Test ein paarweiser Vergleich der MHK-Mediane durchgeführt. Ein statistisch signifikanter Unterschied bei  $\alpha = 0.05$  konnte nur zwischen Cve und Thm nachgewiesen werden.

### 8.2.3 Vergleich der MHK- und MBK-Werte

Die MHK- und MBK-Werte liegen sehr nahe beieinander (Tab. 22). Für Cve, Cvm und Loe sind die MBK-Werte im Durchschnitt nur um das 1.4-fache grösser als die MHK-Werte. Bei der Monosubstanz Thymol (Thm) betrug der Unterschied das 1.77-fache, bei der Monosubstanz Linalool (Lom) das 3.26-fache. Bei Klebsiella waren die MHK und die MBK bei allen eingesetzten Wirkstoffen nahezu identisch. Die grössten zwischenartlichen Unterschiede wurden bei der Monosubstanz Linalool beobachtet. Die MBK war bei Ste und Sta um das 3-fache höher als die MHK, bei Ec sogar um das 9-fache.

MO	Cve [ $\mu\text{g/ml}$ ]					
	Ste	Sta	Sap	Kl	Ec	Ca
<b>MBK</b>	675	253	383	185	397	389
<b>MHK</b>	406	200	296	175	344	199
<b>MBK / MHK</b>	<b>1.66</b>	<b>1.27</b>	<b>1.29</b>	<b>1.06</b>	<b>1.15</b>	<b>1.95</b>

MO	Cvm [ $\mu\text{g/ml}$ ]					
	Ste	Sta	Sap	Kl	Ec	Ca
<b>MBK</b>	600	517	433	235	350	433
<b>MHK</b>	479	300	310	235	335	201
<b>MBK / MHK</b>	<b>1.25</b>	<b>1.72</b>	<b>1.40</b>	<b>1.00</b>	<b>1.04</b>	<b>2.15</b>

MO	Loe [ $\mu\text{g/ml}$ ]					
	Ste	Sta	Sap	Kl	Ec	Ca
<b>MBK</b>	-	3516	4219	1035	1920	2422
<b>MHK</b>	3884	1791	2885	977	1688	1696
<b>MBK / MHK</b>	-	<b>1.96</b>	<b>1.46</b>	<b>1.06</b>	<b>1.14</b>	<b>1.43</b>

MO	Lom [ $\mu\text{g/ml}$ ]					
	Ste	Sta	Sap	Kl	Ec	Ca
<b>MBK</b>	12500	7500	3130	825	15600	3130
<b>MHK</b>	4625	2450	1950	825	1650	1800
<b>MBK / MHK</b>	<b>2.70</b>	<b>3.06</b>	<b>1.61</b>	<b>1.00</b>	<b>9.45</b>	<b>1.74</b>

MO	Thm [ $\mu\text{g/ml}$ ]					
	Ste	Sta	Sap	Kl	Ec	Ca
<b>MBK</b>	1000	1000	625	313	500	625
<b>MHK</b>	675	388	450	210	488	233
<b>MBK / MHK</b>	<b>1.48</b>	<b>2.58</b>	<b>1.39</b>	<b>1.49</b>	<b>1.02</b>	<b>2.68</b>

**Tab. 22:** Vergleich der MHK- und MBK-Werte. Bei den phenolhaltigen Ölen liegen die MHK- und MBK-Werte nahe beieinander ( $\text{MBK} = 1 \text{ bis } 2.5 \times \text{MHK}$ ).

#### 8.2.4 MHK-Werte und Haltbarkeit der Thymianextrakte

Die grampositiven Bakterien reagierten deutlich empfindlicher auf die Extrakte als die gramnegativen Bakterien und *C. albicans*. Die unterschiedlichen Herstellungsverfahren hatten nur einen marginalen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität (Tab. 23). Die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Agar und 4% Ethanol zur Verbesserung der Löslichkeit, hatten keinen Einfluss auf MHK. Der Gehalt der Extrakte an ätherischem Öl betrug gemäss Bionorica 1 % (m/m). Vergleicht man die Ätherischöl-Konzentration der Extrakte mit den Konzentrationen der reinen Öle, so zeigt sich, dass die antimikrobielle Wirkung der Extrakte wohl nur zu einem verschwindend kleinen Teil auf dem ätherischen Öl beruhen kann. Es wäre denkbar, dass weitere Inhaltsstoffe mit antimikrobieller Aktivität in den Extrakten vorkommen, oder dass die Extrakte Stofffraktionen enthalten, die zusammen mit den ätherischen Ölen synergistisch wirken.

Extrakte	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]					
	Ste	Sta	Sap	Kl	Ec	Ca
<b>mikronisiert</b>	<b>313</b>	<b>938</b>	<b>1250</b>	<b>4000</b>	<b>4000</b>	<b>4000</b>
<b>MeOH-Phase</b>	<b>625</b>	<b>1250</b>	<b>2500</b>	<b>8000</b>	<b>8000</b>	<b>8000</b>
<b>Trockenextrakt</b>	<b>625</b>	<b>1250</b>	<b>2500</b>	<b>10000</b>	<b>10000</b>	<b>10000</b>

**Tab. 23:** MHK-Werte unterschiedliche Thymianextrakte. Die Extrakte wirken bei gramnegativen Bakterien und bei Pilzen deutlich weniger stark als bei grampositiven Bakterien.

Im Gegensatz zu den ätherischen Ölen und den Monosubstanzen, bei denen nach einem Jahr Lagerung bei Raumtemperatur im Dunkeln keine Verluste der antimikrobiellen Aktivität beobachtet wurden, verloren die Extrakte durch Lagerung bei 4°C innerhalb eines halben Jahres etwa 75% ihrer antimikrobiellen Aktivität. Ein wesentlicher Teil dieses Verlustes dürfte auf dem Verlust der flüchtigen ätherischen Öle beruhen. Ein weiterer Teil des Aktivitätsverlustes könnte durch oxidative Prozesse bedingt sein, obwohl die Extrakte reich an antioxidative Verbindungen (Flavonoidfraktion) sind und sie im Dunkeln aufbewahrt wurden.

## 8.3 Resultate der Checkerboard-Assays

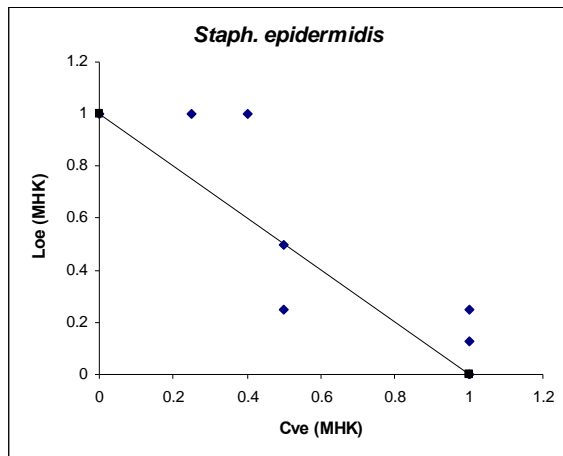
Der Checkerboard-Assay war die Methode der Wahl bei der Suche nach Interaktionseffekten. Die Daten des Checkerboard-Assay werden zuerst in Form von Isobologrammen dargestellt. Isobologramme, bei denen sich ein Trend abzeichnete, enthalten eine Trendlinie sowie Mittelwert und Konfidenzintervall der FICI-Werte.

### 8.3.1 Mischungsverhältnisse der ätherischen Öle

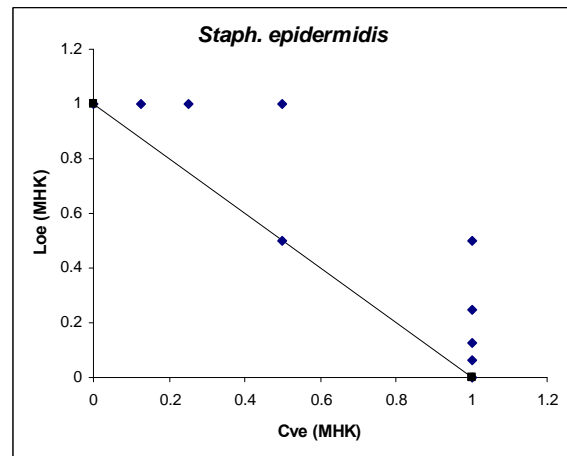
Bei Sap und Ca sind zum Teil Tendenzen erkennbar, die in Richtung additive Wirkung zeigen. Die Konfidenzintervalle liegen aber in all diesen Fällen ausserhalb des Grenzwertes von  $FICI = 0.5$ . Einzig bei *K. pneumoniae* enthält das Konfidenzintervall den Grenzwert 0.5. In keinem Fall jedoch liegt das Konfidenzintervall ganz unterhalb des Grenzwertes. Es handelt sich deshalb bei den beobachteten Trends in Gegenwart von *K. pneumoniae* nur um partiellen Synergismus. Der Mischungsbereich mit partiellem Synergismus erstreckt sich bei [Cve / Loe] über einen weiten Bereich von [16 / 1] bis [1 / 120].

### 8.3.2 Mischungsverhältnisse der Monosubstanzen

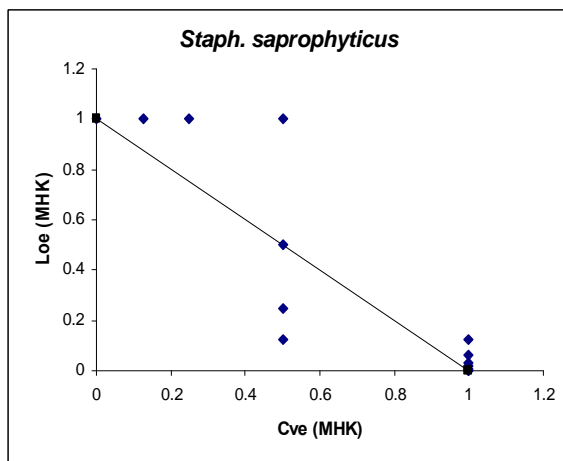
Da tendenziell überadditive Effekte nur in Gegenwart von *Klebsiella* auftraten, wurden nur Mischungen der Monosubstanzen mit *Klebsiella* untersucht. Es wurden je drei Checkerboard Assays mit Carvacrol und Linalool sowie mit Thymol und Linalool durchgeführt. Die Mittelwerte der beiden Gruppen unterschieden sich nicht. Eines der drei CI der Thm-Lom-Mischung lag ausserhalb des Grenzwertes von 0.5. Der Mischungsbereich erstreckt sich bei [Cvm / Lom] von [4 / 1] bis [1 / 60] und bei [Thm / Lom] von [1 / 2] bis [1 / 120].



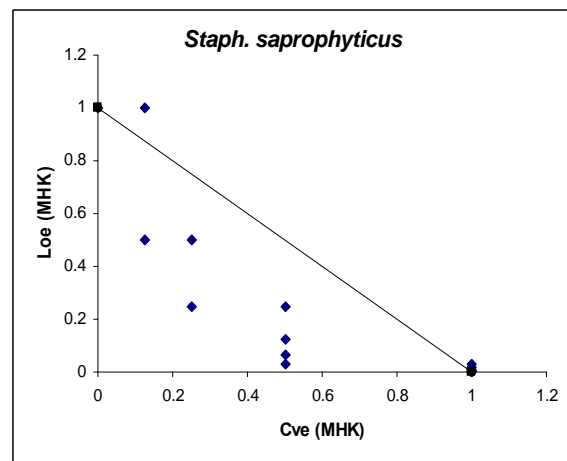
a) Kombinationen aus Cve und Loe inkubiert mit Ste.



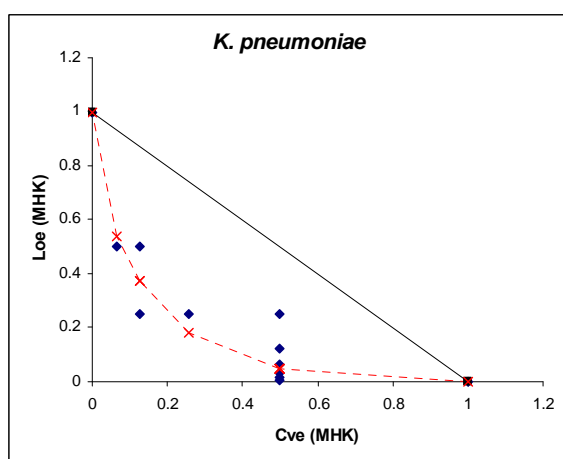
b) Kombinationen aus Cve und Loe inkubiert mit Ste.



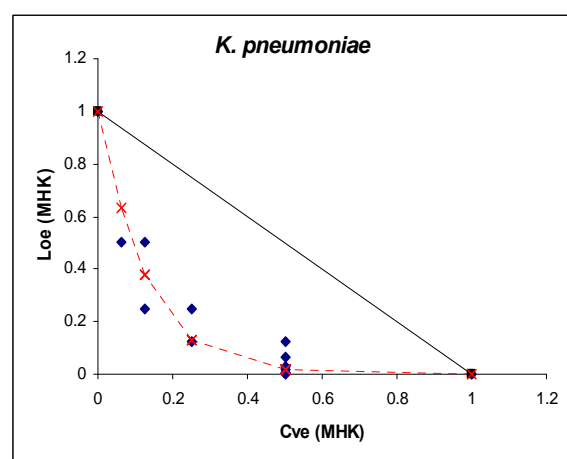
c) Kombinationen aus Cve und Loe inkubiert mit Sap.



d) Kombinationen aus Cve und Loe inkubiert mit Sap.



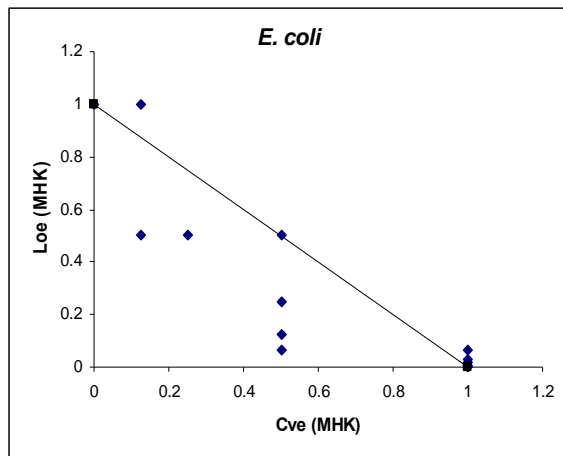
e) Kombinationen aus Cve und Loe inkubiert mit KI.



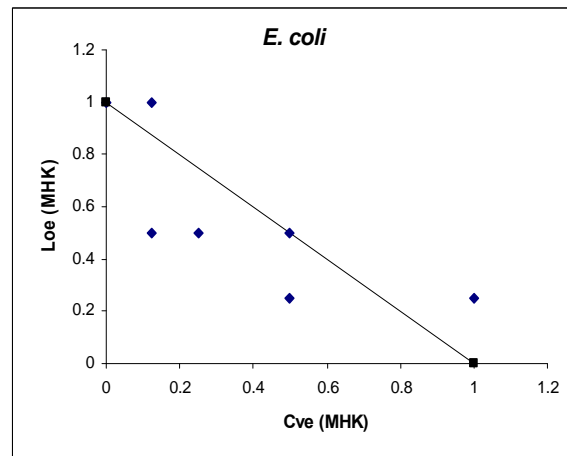
f) Kombinationen aus Cve und Loe inkubiert mit KI

**Abb. 36 a-f):** Darstellung der Kombinationseffekte von Mischungen aus Carvacrolöl (Cve) und Linaloolöl (Loe) bei Ste, Sap und KI in Form von Isobologrammen.

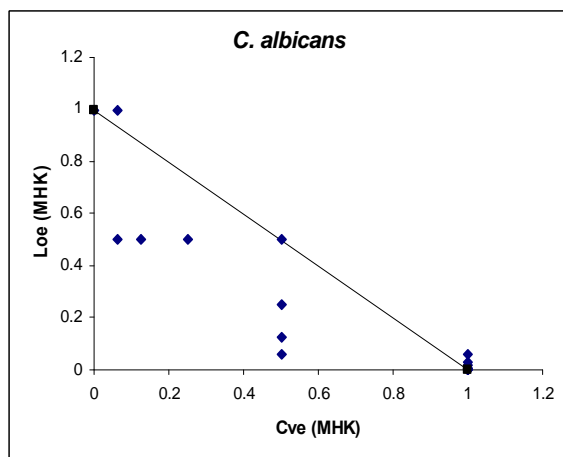




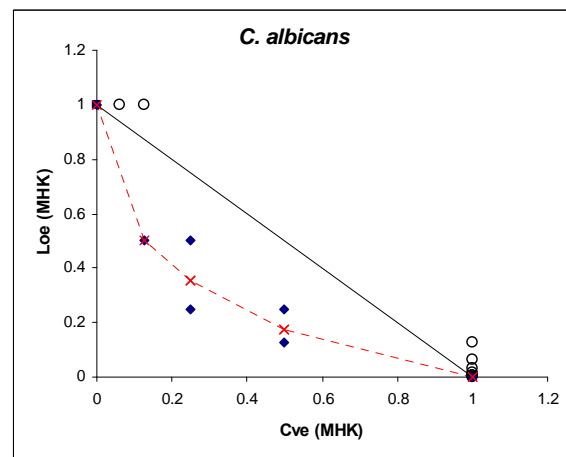
a) Kombinationen aus Cve und Loe inkubiert mit Ec.



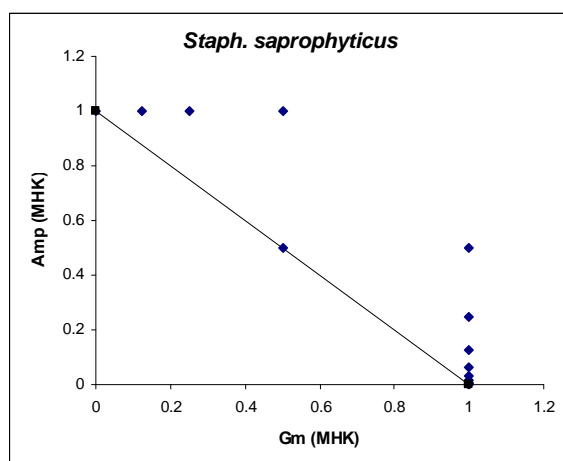
b) Kombinationen aus Cve und Loe inkubiert mit Ec.



c) Kombinationen aus Cve und Loe inkubiert mit Ca.



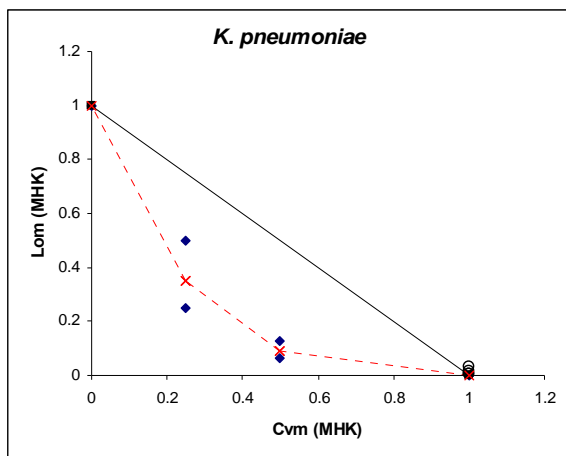
d) Kombinationen aus Cve und Loe inkubiert mit Ca.



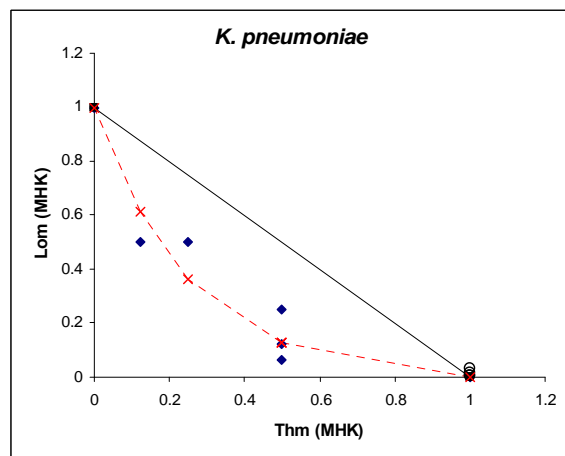
e) Kombinationen aus Gm und Amp inkubiert mit Sap.

**Abb. 37 a-d):** Darstellung der Kombinationseffekte von Mischungen aus Carvacrolöl (Cve) und Linaloolöl (Loe) bei Ec, Ca und KI in Form von Isobologrammen.

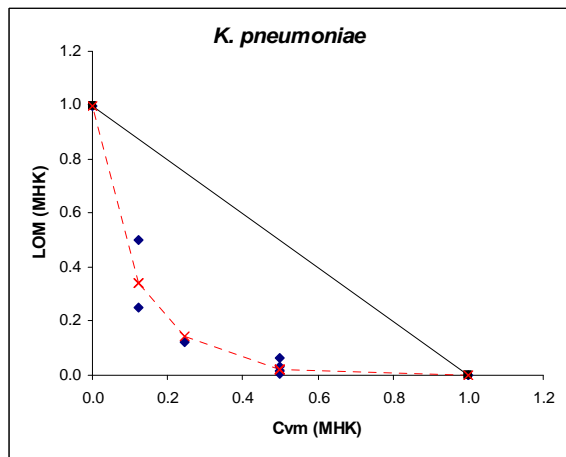
**Abb. 36 e):** Kombinationseffekte der beiden Antibiotika Ampicillin und Gentamycin mit Sap.



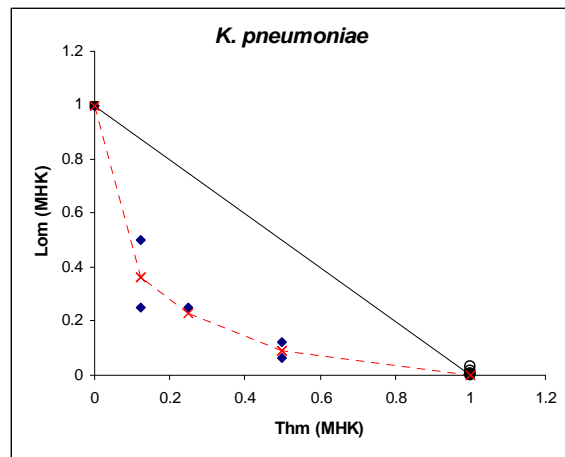
a) Kombinationen aus Cvm und Lom inkubiert mit KI.



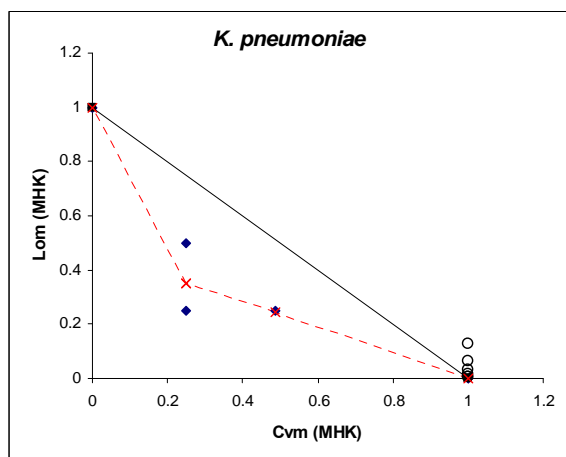
b) Kombinationen aus Thm und Lom inkubiert mit KI.



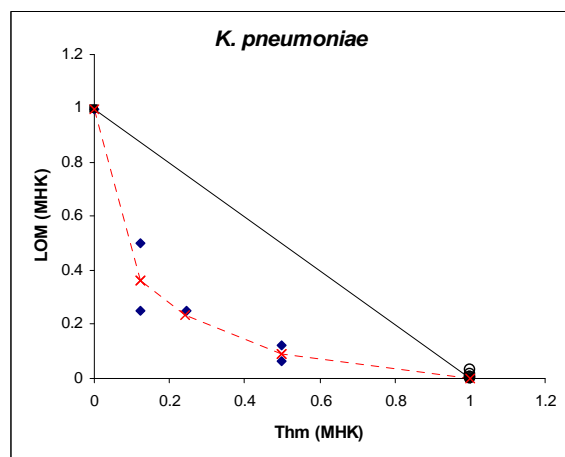
c) Kombinationen aus Cvm und Lom inkubiert mit KI.



d) Kombinationen aus Thm und Lom inkubiert mit KI.

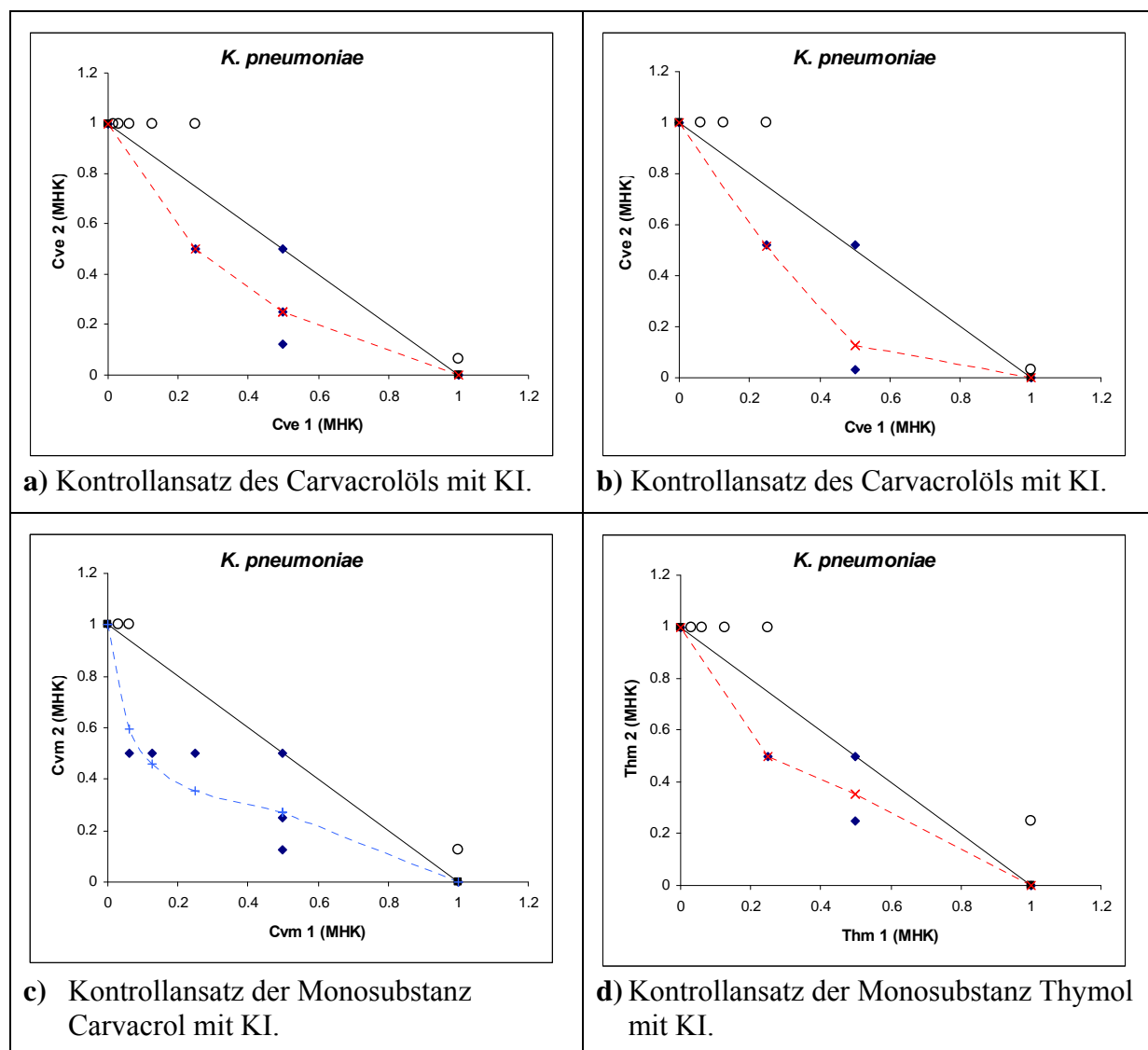


e) Kombinationen aus Cvm und Lom inkubiert mit KI.

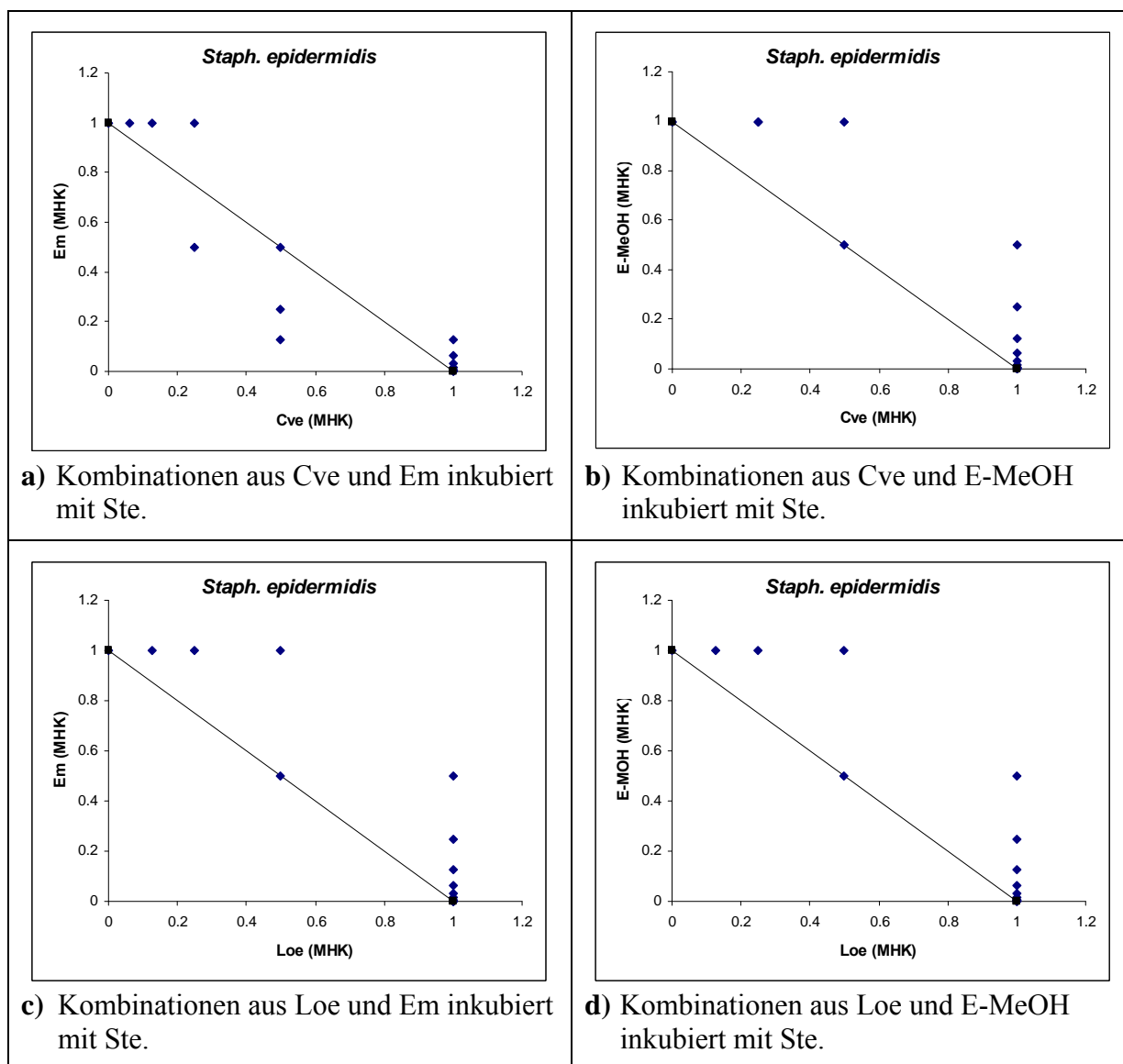


f) Kombinationen aus Thm und Lom inkubiert mit KI.

**Abb. 38 a-f):** Isobologramme zur Wirkung von Mischungen aus den Monosubstanzen Cvm, Thm und Lom mit *Klebsiella pneumoniae*.

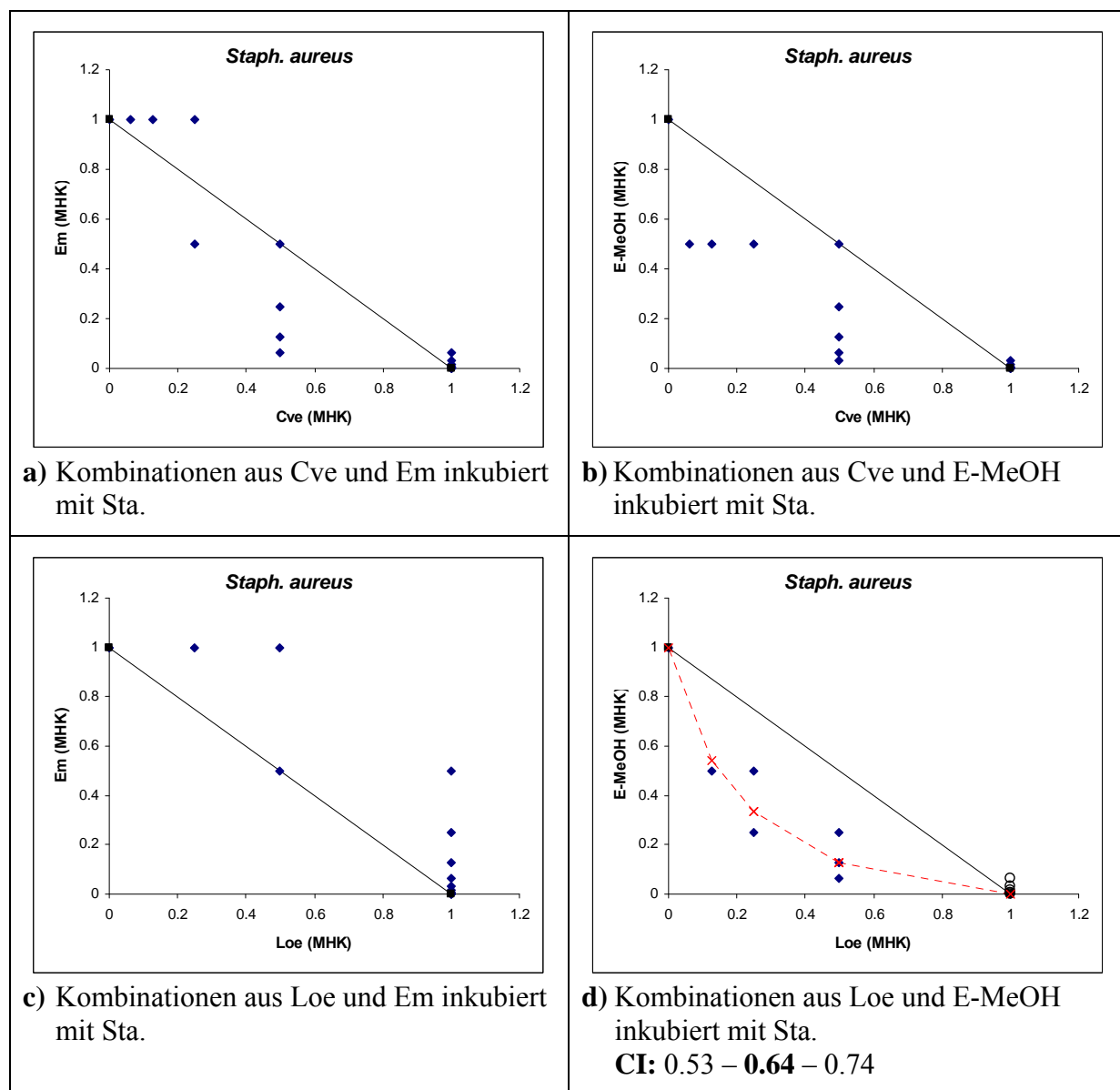


**Abb. 39 a-d):** Die Kontrollansätze (Sham-Assays) wiesen alle eine Tendenz in Richtung überadditiven Effekt auf (falsch-positive Ergebnisse).

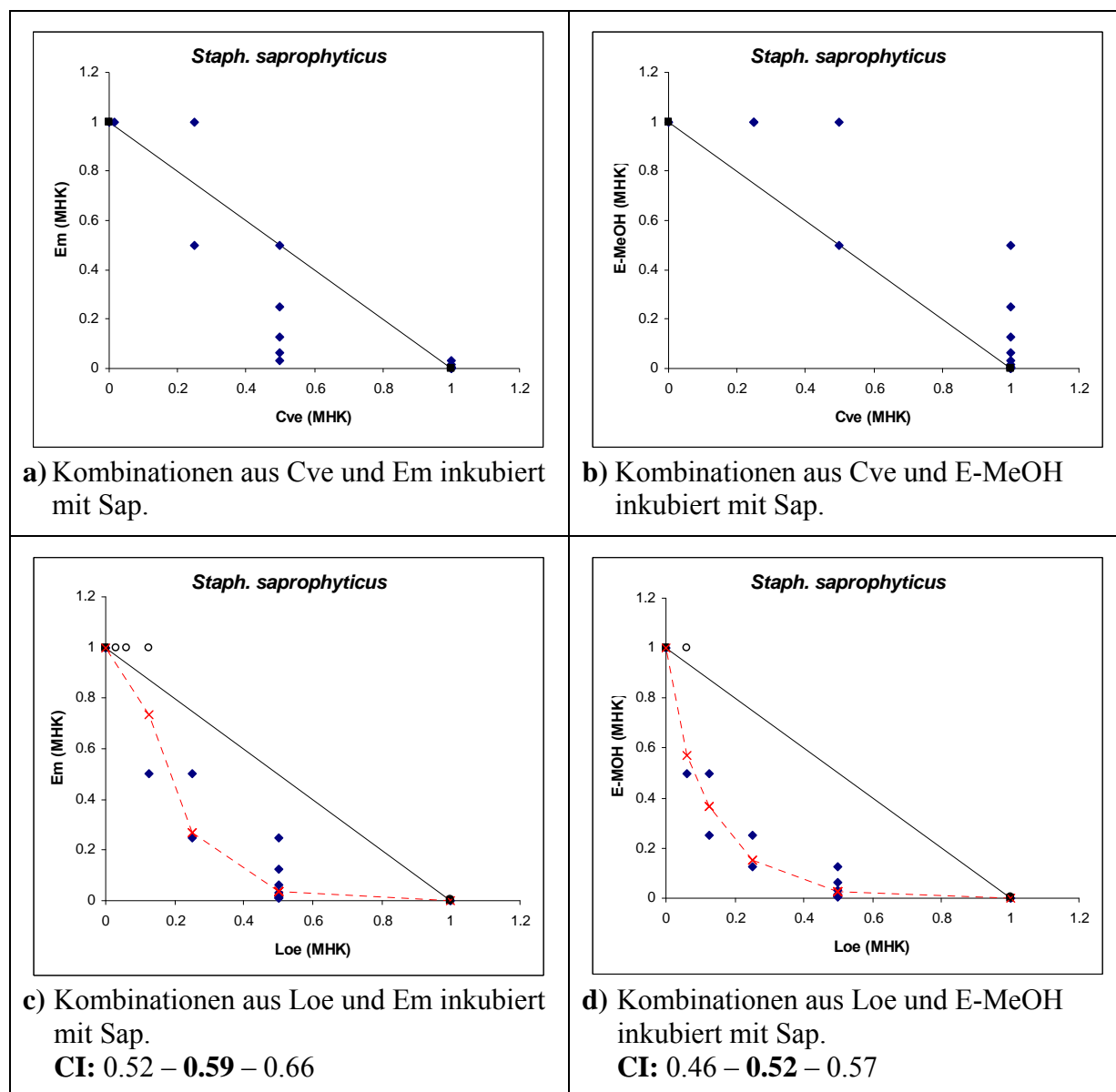


**Abb. 40 a-d):** Kombinationseffekte von Mischungen der ätherischen Öle und den Extrakten bei *Staph. epidermidis*. Es konnte keine Tendenz zu überadditiven Effekten beobachtet werden.

(Em = mikronisierter Extrakt; E-MeOH = Extrakt einer MeOH-Phase)



**Abb. 41 a-d):** Kombinationseffekte von Mischungen der ätherischen Öle und den Extrakten bei *Staph. aureus*. Die Kombination Linaloolöl und MeOH-Extrakt zeigte tendenziell überadditive Effekte.  
 (Em = mikronisierter Extrakt; E-MeOH = Extrakt einer MeOH-Phase)



**Abb. 42 a-d):** Kombinationseffekte von Mischungen der ätherischen Öle mit den Extrakten bei *Staph. saprophyticus*. Die Kombinationen des Linaloolöls mit den beiden Extrakten zeigten tendenziell c) überadditive Effekte und d) partiellen Synergismus. (Em = mikronisierter Trockenextrakt; E-MeOH = Trockenextrakt der MeOH-Phase)

### 8.3.3 Zusammenfassung der Checkerboard-Resultate

Zur Berechnung der Konfidenzintervalle wurden die FICI-Werte der identischen Checkerboard-Assays zusammengefasst. Die Rand- und Eckpunkte wurden nicht berücksichtigt (siehe: 6.5.3.3 & 6.5.3.7).

#### Kombinationen des Carvacrol- und Linaloolöls:

MO: Kombination	Konfidenzintervall	Effekt
Ste: Cve & Loe	0.75 – <b>0.92</b> – 1.09	rein additiv
Sap: Cve & Loe	0.56 – <b>0.64</b> – 0.72	überadditiv
Kl: Cve & Loe	0.46 – <b>0.51</b> – 0.56	partiell synergistisch
Ec: Cve & Loe	0.64 – <b>0.74</b> – 0.85	überadditiv
Ca: Cve & Loe	0.59 – <b>0.68</b> – 0.76	überadditiv

#### Kombinationen der Monosubstanzen mit *K. pneumoniae*:

MO: Kombination	Konfidenzintervall	Effekte
Kl: Cvm & Lom	0.49 – <b>0.56</b> – 0.63	partiell synergistisch
Kl: Thm & Lom	0.52 – <b>0.58</b> – 0.64	überadditiv

#### Sham-Assays mit *K. pneumoniae*:

MO: Kombination	Konfidenzintervall	Effekte
Kl: Cve & Cve	0.59 – <b>0.71</b> – 0.81	überadditiv
Kl: Cvm & Cvm	0.57 – <b>0.72</b> – 0.87	überadditiv
Kl: Thm & Thm	0.64 – <b>0.83</b> – 1.02	rein additiv

**Legende:** **CI** enthält 1: rein additiv  
0.5 < **CI** < 1: überadditiv  
**CI** enthält 0.5: partiell synergistisch  
**CI** ≤ 0.5: synergistisch

Es konnte in keinem Fall ein synergistischer Effekt beobachtet werden. Auffällig sind die Ergebnisse der Sham-Assays, die alle eine Tendenz in Richtung überadditiven Effekt aufweisen (falsch-positive Ergebnisse) und die Tatsache, dass kein einziger antagonistischer Effekt beobachtet wurde.

### 8.3.4 Mischungsbereiche mit additiven Effekten

Die Mischungsverhältnisse bei denen additive Effekte beobachtet wurden, erstreckten sich bei den Monosubstanzen [Cvm / Lom] über einen Bereich von [4 / 1] bis [1 / 60], das heisst [Lom]  $\geq$  20% und bei der Kombination [Thm / Lom] über einen Bereich von [1 / 2] bis [1 / 120], das heisst [Lom]  $\geq$  66%.

Da die beiden Vielstoffgemische Cve und Loe ebenfalls aus einer Mischung von Cvm, Thm und Lom bestehen, entsprechen die Mischungsverhältnisse [16 / 1] und [1 / 120] nicht der tatsächlichen Zusammensetzung der Stoffe [Cvm + Thm / Lom]. Die tatsächlichen Mischungsverhältnisse und die Spannbreite musste mit Hilfe der Gc-Analyse berechnet werden (siehe Anhang).

#### Maximales Mischungsverhältnis:

$$\frac{\text{Cve}}{\text{Loe}} = \frac{16}{1} \Rightarrow \frac{\text{Cvm} + \text{Thm}}{\text{Lom}} = \frac{6}{1}$$

#### Minimales Mischungsverhältnis:

$$\frac{\text{Cve}}{\text{Loe}} = \frac{1}{120} \Rightarrow \frac{\text{Cvm} + \text{Thm}}{\text{Lom}} = \frac{1}{16}$$

Der Mischungsbereich der Kombinationen Carvacrolöl und Linaloolöl erstreckt sich von [Cvm + Lom / Lom] = [6/1] bis [1/16]. Der minimale Anteil an Lom beträgt demzufolge [Lom]  $\geq$  14%. Im Carvacrolöl ist Linalool aber mit einem Anteil von nur 3% vertreten. Bei diesem geringen Anteil an Lom sind keine additiven Effekte im Carvacrolöl zu erwarten, die auf Wechselwirkungen von Carvacrol mit Linalool und/oder Thymol mit Linalool beruhen, denn diese traten im Carvacrolöl erst ab einem minimalen Anteil von 14% Lom auf.

Im Linaloolöl liegen dagegen Mischungsverhältnisse vor, die eine additive Wechselwirkung erwarten lassen [Cvm + Thm / Lom] = [1 / 19]. Das entspricht einem Lom-Anteil von 95%. Artifizielle Kombinationen, bestehend aus den Hauptkomponenten des Linaloolöls, konnten jedoch nicht untersucht werden, weil mit Linalool in den erforderlichen Konzentrationen Löslichkeitsprobleme auftraten.

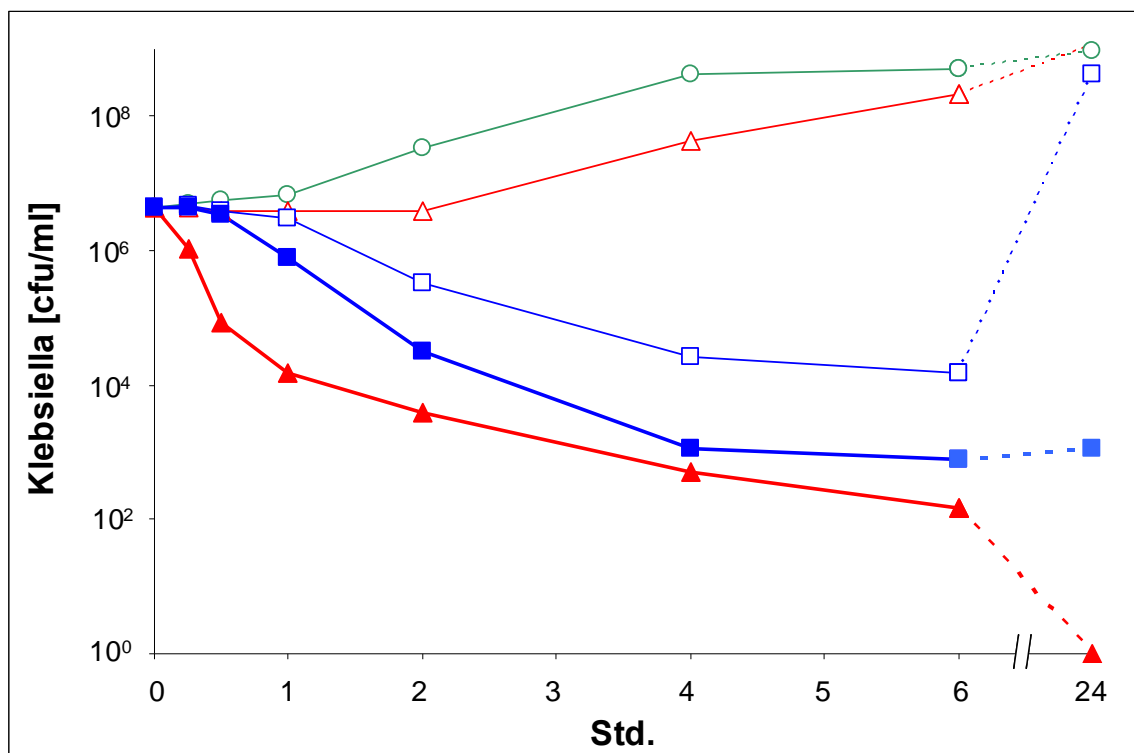


## 8.4 Time-Kill-Resultate

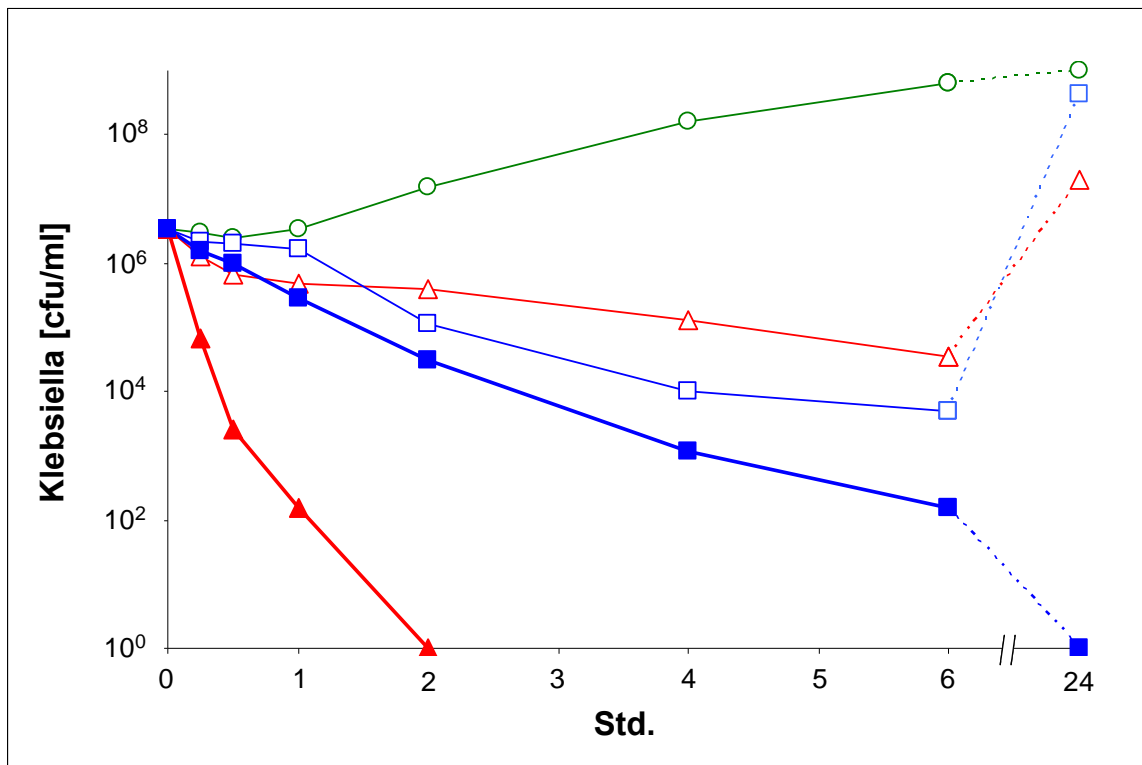
### 8.4.1 Konzentrationsabhängigkeit der Absterberate

Mit Hilfe der Time-Kill-Methode konnte der zeitliche Verlauf der antimikrobiellen Wirkung, die Absterbekinetik, erfasst werden. Ein Vergleich der Absterberate von Carvacrolöl mit dem Antibiotikum Gentamycin zeigt, dass sich die Absterberate der beiden Substanzen, bei Erhöhung der eingesetzten Konzentrationen über die MHK hinaus, deutlich unterscheiden (Abb. 43). Ätherischöl Konzentrationen von 2-MHK führten zu einer deutlichen Beschleunigung der Absterberate. Eine Verdoppelung der Gentamycin Konzentration auf 2-MHK bewirkte dagegen nur eine geringfügige Erhöhung der Absterberate.

Mit Gentamycin war die Streuung der Absterbekurven wesentlich geringer als mit Carvacrolöl, die Reproduzierbarkeit folglich deutlich besser. Die Beschleunigung der Absterberate durch die Konzentrationserhöhung von 1- auf 2-MHK Carvacrolöl erreichte aber in beiden Versuchen in etwa das gleiche Ausmass (Abb. 43 & 44).

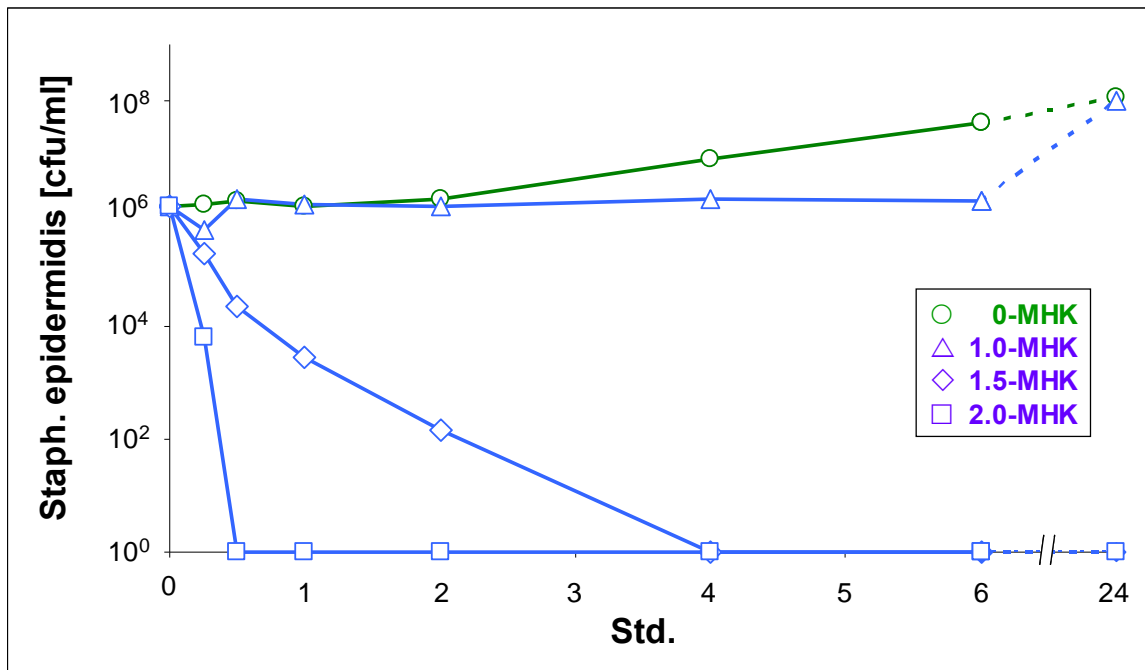


**Abb. 43:** Absterberaten von *Klebsiella pneumoniae* in Gegenwart von 200 und 400 µg/ml Cve und 0.3 und 0.6 µg/ml Gm. (○ 0-Kontrolle, □ Gm 1-MHK, ■ Gm 2-MHK, △ Cve 1-MHK, ▲ Cve 2-MHK).

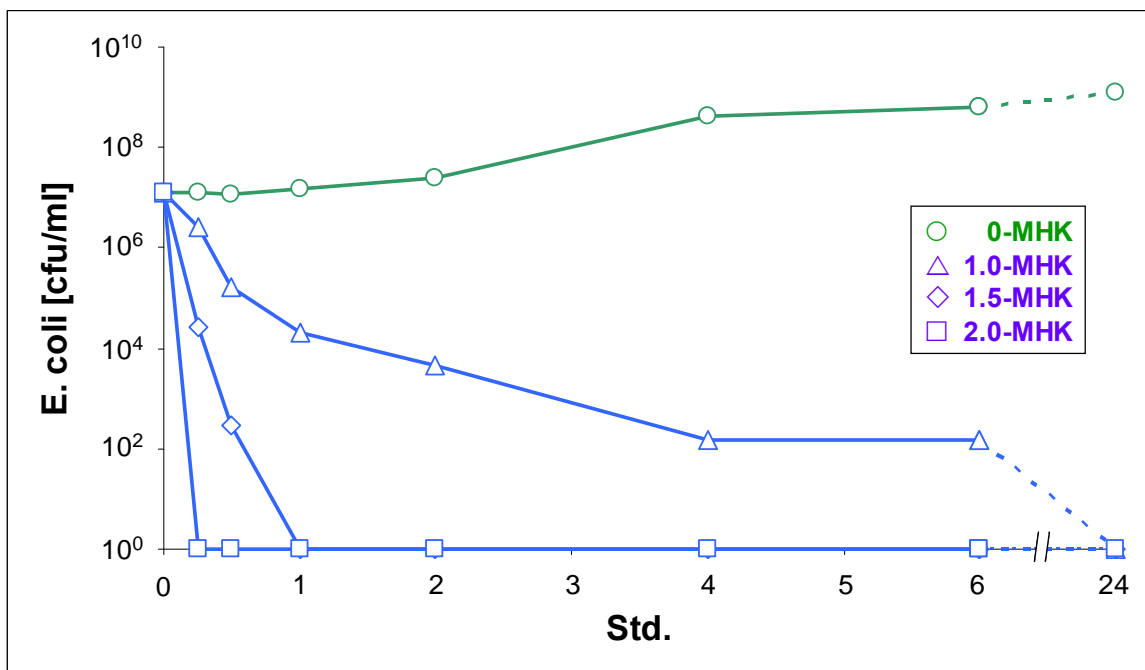


**Abb. 44:** Absterberaten von *Klebsiella pneumoniae* in Gegenwart von 200 und 400 µg/ml Cve und 0.3 und 0.6 µg/ml Gm (○ 0-Kontrolle, □ Gm 1-MHK, ■ Gm 2-MHK, △ Cve 1-MHK, ▲ Cve 2-MHK).

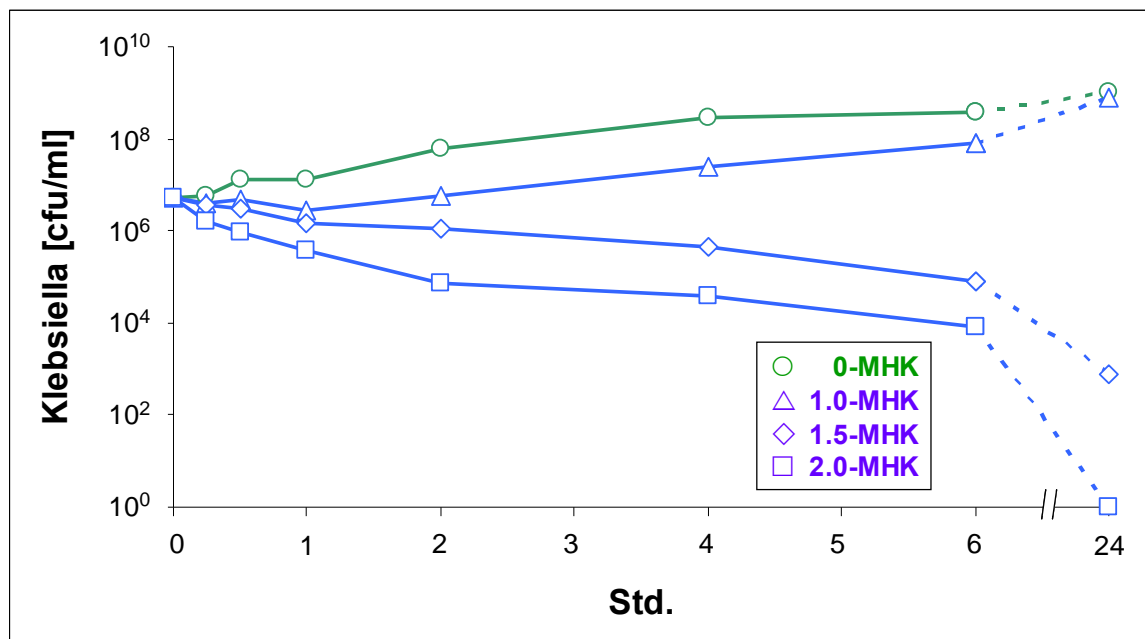
In dem schmalen Bereich zwischen 1-3 MHK lässt sich die konzentrationsabhängige Beschleunigung der Absterberate gut verfolgen. 1 MHK wirkt in der Regel bakteriostatisch. Eine Erhöhung der Konzentration auf 1.5 MHK ( $\approx$ MBK) führt innerhalb von 4 Stunden zum vollständigen Absterben der Mikroorganismen. Die bakterizide Konzentration stimmt gut mit MBK-Wert überein bzw. mit dem MBK/MHK-Verhältnis von 1.4 für Cve, Cvm und Loe und 1.77 für Thm. Bei Konzentrationen oberhalb von 3 MHK kann eine allfällige Zunahme der Beschleunigung mit der Time-Kill Methode nicht mehr zufrieden stellend erfasst werden, da bei diesen Konzentrationen ( $\geq 3$  MHK) in der Regel alle untersuchten Keime innerhalb von 15 Minuten erradiziert werden (Abb. 45-47).



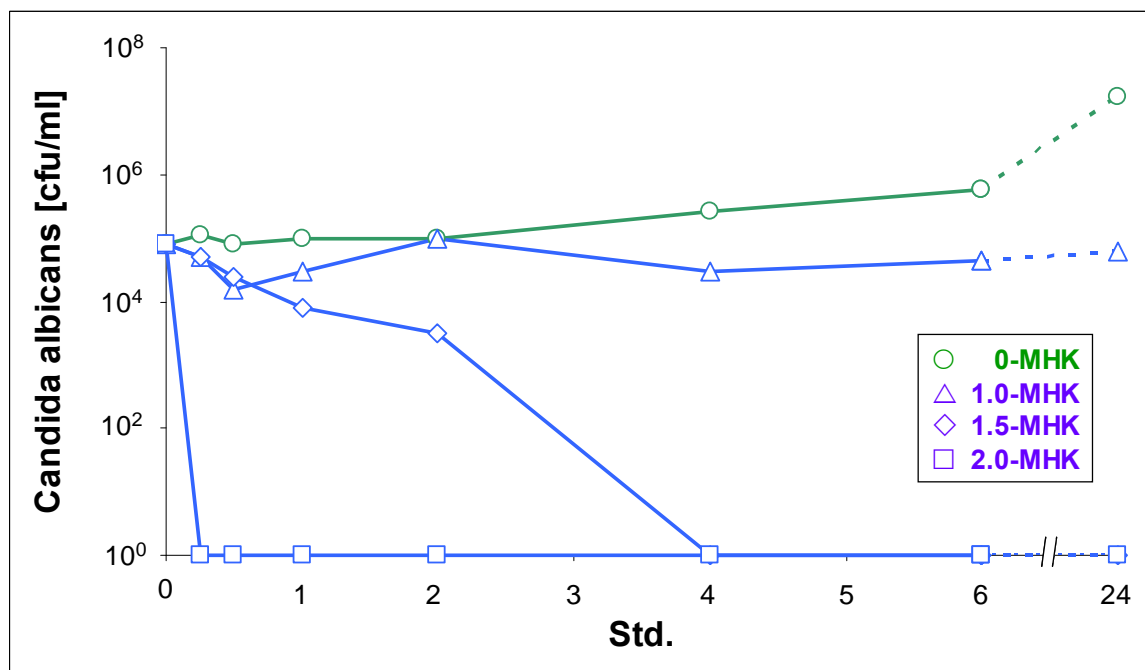
**Abb. 45:** Absterberaten von *Staphylokokkus epidermidis* in Gegenwart von 1, 1.5 und 2-MHK Thymol (○ 0-Kontrolle, △ 1-MHK Thm, ◇ 1.5-MHK Thm und □ 2-MHK Thm).



**Abb. 46:** Absterberaten von *Escherichia coli* in Gegenwart von 1, 1.5 und 2-MHK Thymol (○ 0-Kontrolle, △ 1-MHK Thm, ◇ 1.5-MHK Thm und □ 2-MHK Thm).



**Abb. 47:** Absterberaten von *Klebsiella pneumoniae* in Gegenwart von 1, 1.5 und 2-MHK Thymol (○ 0-Kontrolle, △ 1-MHK Thm, ◇ 1.5-MHK Thm und □ 2-MHK Thm).



**Abb. 48:** Absterberaten von *Candida albicans* in Gegenwart von 1, 1.5 und 2-MHK Carvacrol (○ 0-Kontrolle, △ 1-MHK Cve, ◇ 1.5-MHK Cve und □ 2-MHK Cve).

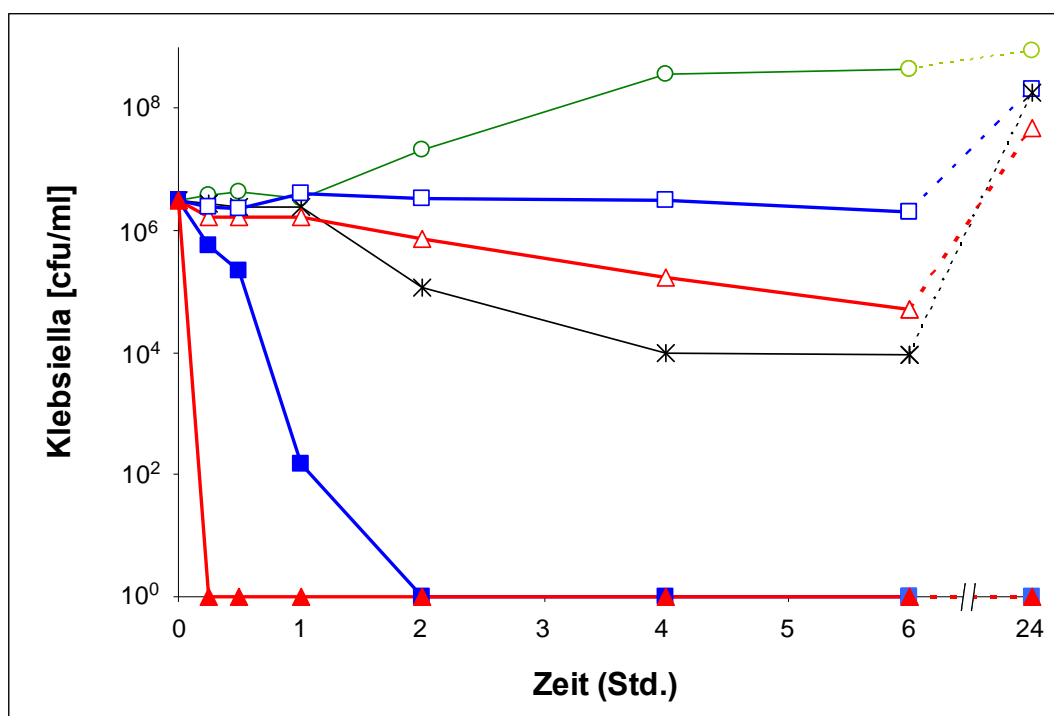
#### 8.4.2 Artificielle Kombinationen

Die mittels Gc-Analyse bestimmte quantitative Zusammensetzung des nativen Carvacrolöls zeigt, dass der partielle Synergismus, der im ChA beobachtet werden konnte, im nativen Carvacrolöl keine Rolle spielt, weil das Mischungsverhältnis der fraglichen Wirkstoffe im Carvacrolöl ein ganz anderes ist als das jener Mischungen, bei denen im ChA partieller Synergismus auftrat.

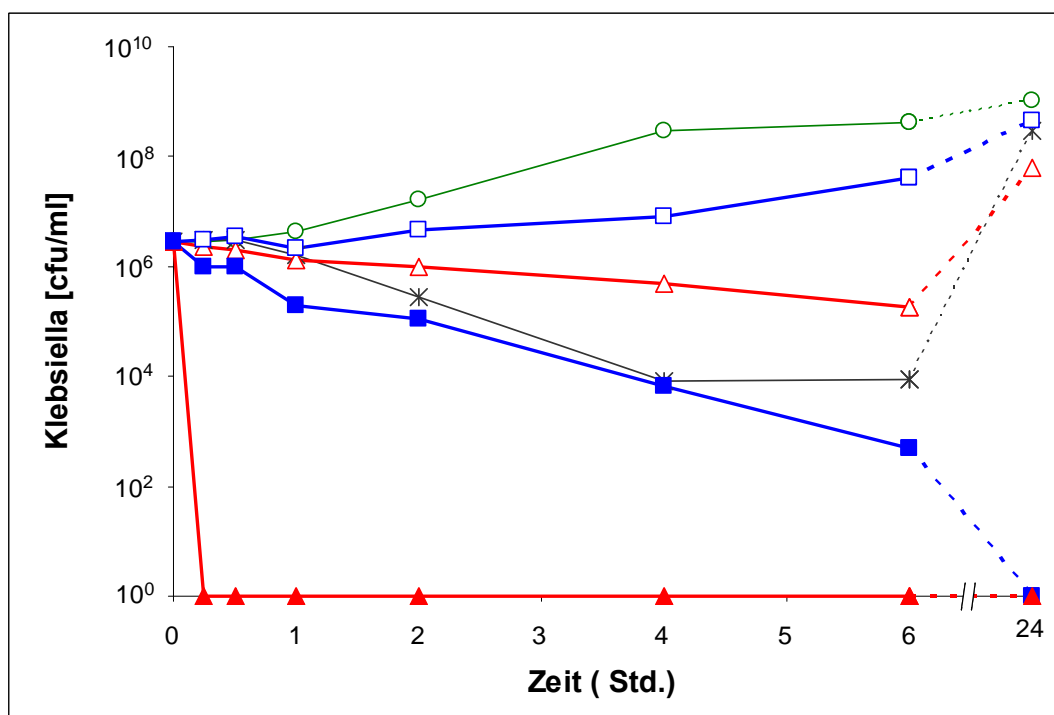
Um den allfälligen Einfluss der restlichen (unwirksamen) Komponenten ( $R_i$ ) zu untersuchen, wurden artificielle Kombinationen hergestellt. Diese artificuellen Kombinationen setzten sich aus den zwei (AcII = CT) bzw. drei (AcIII = CTL) Wirkstoffen zusammen. Die Mischungen der Wirkstoffe wurden so zusammengestellt, dass sie den Konzentrationen des nativen Carvacrolöls entsprachen. Es handelte sich bei den artificuellen Kombinationen im Grunde genommen um artificuelle Fraktionen des nativen Öls (S. 58, Abb. 26). Pro Versuchsansatz wurden jeweils zwei unterschiedliche Konzentrationen des Carvacrolöls (Cve) mit zwei entsprechenden Konzentrationen der artificuellen Kombination (Ac) verglichen. Mitgeführt wurden eine Null-Kontrolle und eine Positivkontrolle mit Gentamycin. Konzentrationen zwischen 1 – 4 MHK (200 – 800 [ $\mu\text{g/ml}$ ]) wurden getestet. Bei 200 und 300 [ $\mu\text{g/ml}$ ], also bei Konzentrationen in der Grössenordnung von 1 MHK, traten keine signifikanten Unterschiede zwischen Cve und Ac auf (Abb. 49-52). In Gegenwart von 600 [ $\mu\text{g/ml}$ ] Carvacrolöl war die Kill-Rate verglichen mit der artificuellen CT-Kombination (AcII) deutlich erhöht. Nach 24 Stunden hatte die CT-Kombination aber aufgeholt und ebenfalls alle Keime zum Abstreben gebracht, womit die Definition für Synergismus nicht mehr erfüllt war (Abb. 50). Synergismus liegt bei der Time-Kill-Methode vor, wenn die Kombination (AB) nach 24 Stunden im Vergleich zur aktiveren der beiden Monosubstanzen (A) eine 100-fache Reduktion der Keimdichte aufweist:  $A/(AB) \geq 10^2$  in cfu/ml. Die Zeitdifferenz bis zum Erreichen der vollständigen Erradikation betrug beim ersten Ansatz  $1\frac{3}{4}$  und beim zweiten Ansatz mehr als 6 Stunden.

Im Konzentrationsbereich zwischen 400 und 600 [ $\mu\text{g/ml}$ ] erreichte das native Carvacrolöl nach 24 Stunden stets eine Reduktion der Keimzahl, die um mehr als  $10^2$  cfu/ml grösser war als die der artificuellen Dreierkombination CTL, womit das Kriterium für eine synergistische Überlegenheit des Carvacrolöls gegenüber der CTL-Kombination erfüllt war (Abb. 52 & 53, Tab. 24).

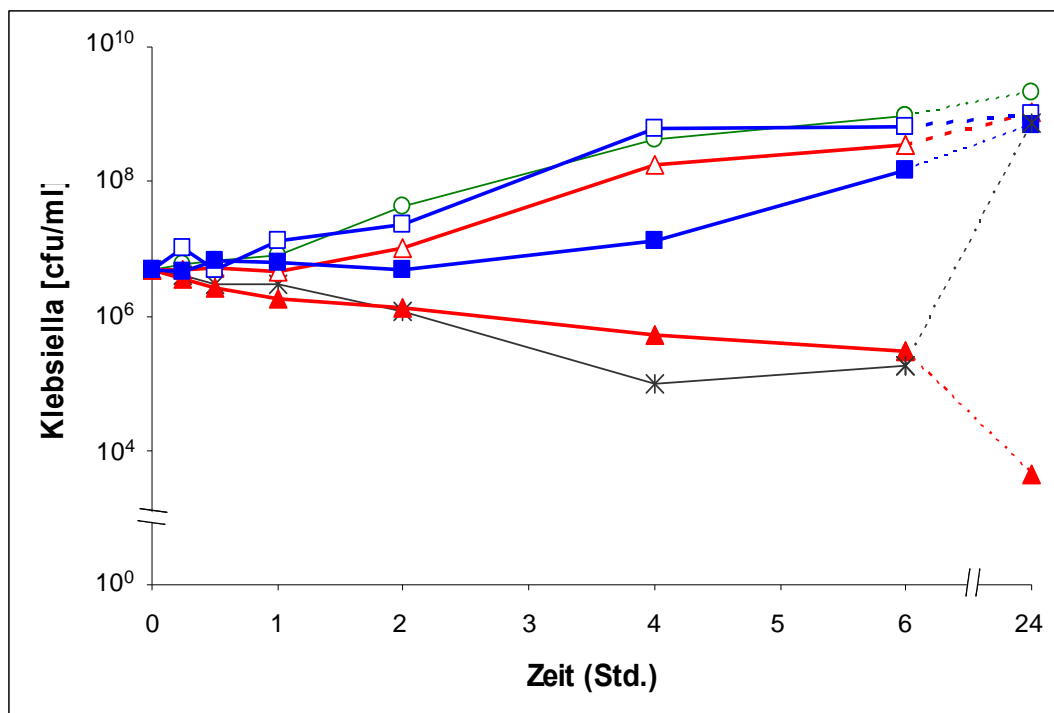
Bei der Konzentration von 800 [ $\mu\text{g/ml}$ ] ätherischem Öl bzw. CTL konnte mit der Time-Kill-Methode kein Unterschied zwischen Cve und der CTL-Kombination mehr festgestellt werden, da die TKM an die Grenze ihrer zeitlichen Auflösung stiess (Abb. 54).



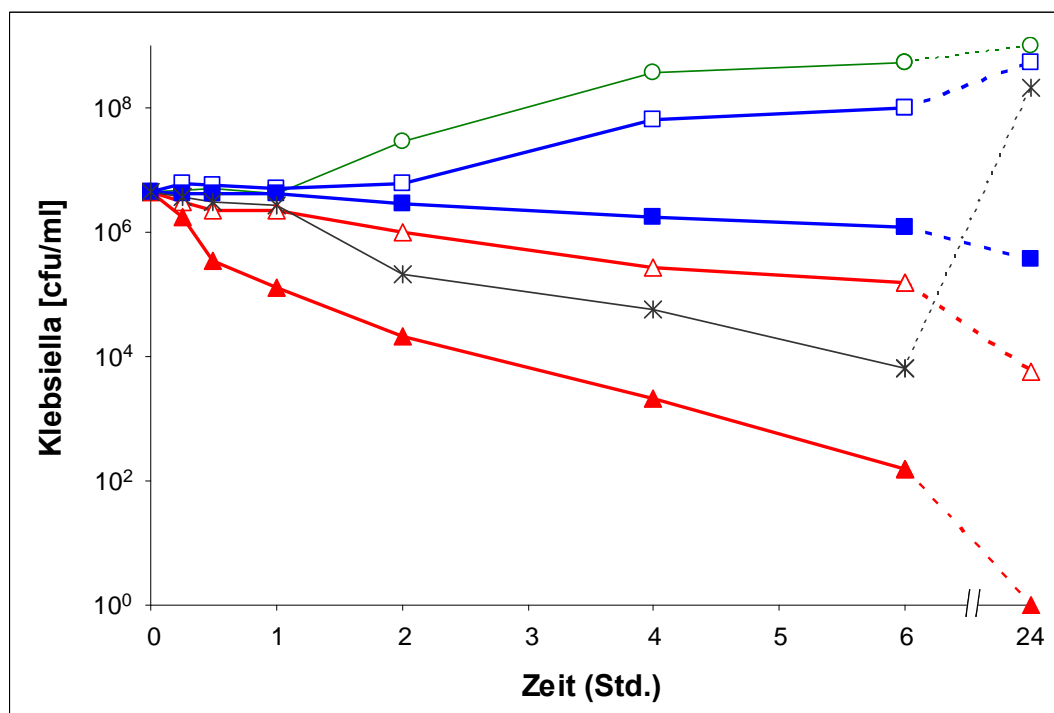
**Abb. 49:** Ac II.1\_300 & 600 Absterberaten von *Klebsiella pneumoniae* in Gegenwart von 300 und 600 µg/ml Cve und CT (Cvm & Thm). ○ 0-Kontrolle, \* Gm 0.5 µg/ml, □ CT 300 µg/ml, ■ CT 600 µg/ml, △ Cve 300 µg/ml, ▲ Cve 600 µg/ml



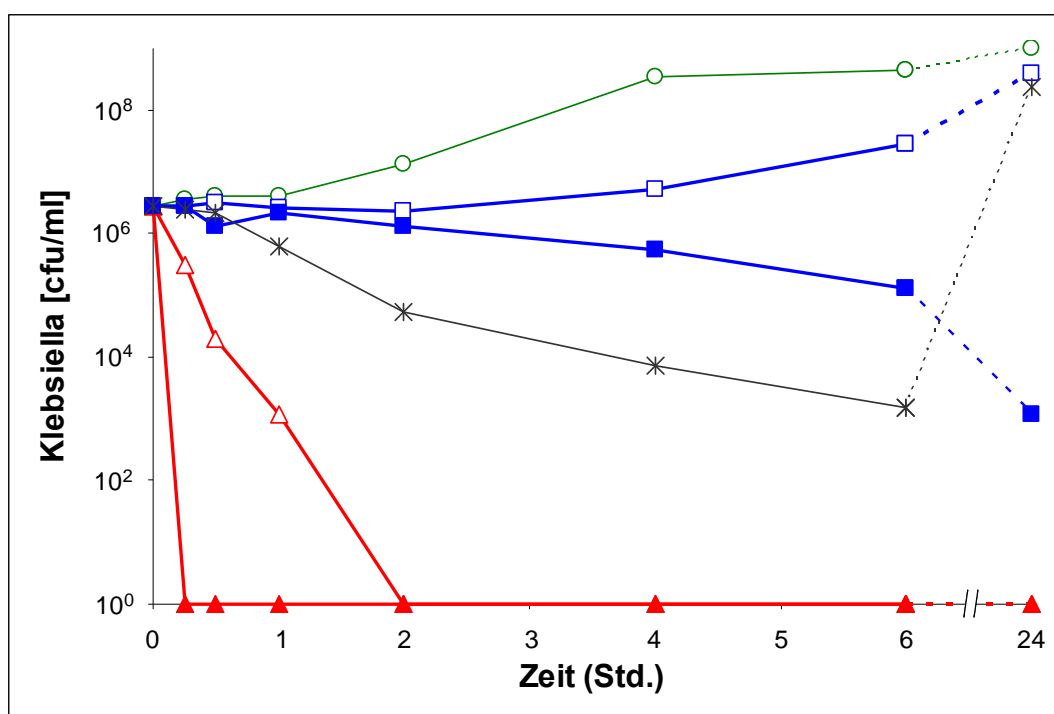
**Abb. 50:** Ac II.2\_300 & 600 Absterberaten von *Klebsiella pneumoniae* in Gegenwart von 300 und 600 µg/ml Cve und CT (Cvm & Thm). ○ 0-Kontrolle, \* Gm 0.5 µg/ml, □ CT 300 µg/ml, ■ CT 600 µg/ml, △ Cve 300 µg/ml, ▲ Cve 600 µg/ml



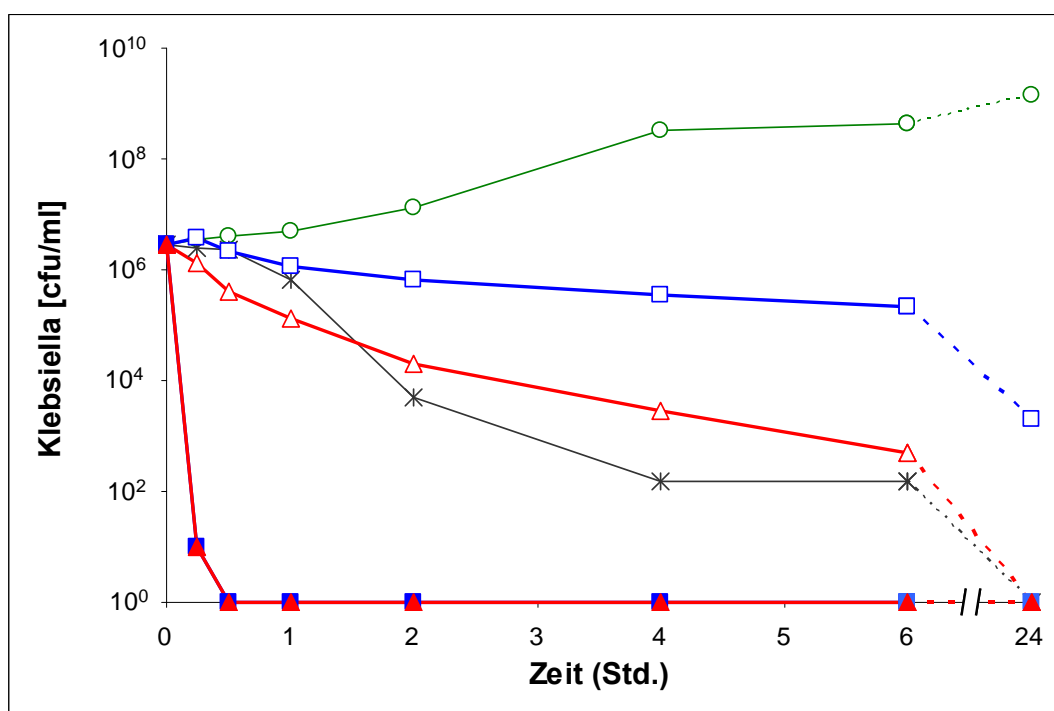
**Abb. 51:** Ac III.1\_200 & 400 Absterberaten von *Klebsiella pneumoniae* in Gegenwart von 200 und 400 µg/ml Cve und CTL (Cvm, Thm & Lom). ○ 0-Kontrolle, \* Gm 0.5 µg/ml, □ CTL 200 µg/ml, ■ CTL 400 µg/ml, △ Cve 200 µg/ml, ▲ Cve 400 µg/ml



**Abb. 52:** Ac III.2\_400 & 600 Absterberaten von *Klebsiella pneumoniae* in Gegenwart von 400 und 600 µg/ml Cve und CTL (Cvm, Thm & Lom). ○ 0-Kontrolle, \* Gm 0.5 µg/ml, □ CTL 400 µg/ml, ■ CTL 600 µg/ml, △ Cve 400 µg/ml, ▲ Cve 600 µg/ml



**Abb. 53:** Ac III.3.L2\_400 & 600 Absterberaten von *Klebsiella pneumoniae* in Gegenwart von 400 und 800 µg/ml Cve und CTL (Cvm, Thm & Lom). ○ 0-Kontrolle, \* Gm 0.5 µg/ml, □ CTL 400 µg/ml, ■ CTL 600 µg/ml, △ Cve 400 µg/ml, ▲ Cve 600 µg/ml



**Abb. 54:** Ac III.4\_400 & 800 Absterberaten von *Klebsiella pneumoniae* in Gegenwart von 400 und 600 µg/ml Cve und CTL (Cvm, Thm & Lom). ○ 0-Kontrolle, \* Gm 0.5 µg/ml, □ CTL 400 µg/ml, ■ CTL 800 µg/ml, △ Cve 400 µg/ml, ▲ Cve 800 µg/ml.



### 8.4.3 Zusammenfassung der Resultate

Die tabellarische Zusammenfassung zeigt, dass die synergistische Überlegenheit des Vielstoffgemisches Cve nur in einem relativ engen Konzentrationsbereich mit Hilfe der Time-Kill-Methode sichtbar wird (Tab. 24). Bei Konzentrationen unter 1 MHK treten keine synergistischen Effekte auf und bei Konzentrationen über 3 MHK stösst die Methode an ihre Grenzen. Innerhalb des engen Konzentrationsbereiches von 400 bis 600 µg/ml Carvacrolöl sind die Resultate weitgehend konsistent.

Einzig die beiden AcII Kombinationen mit 600 µg/ml, bei denen kein Synergismus beobachtet wurde, fallen etwas aus der Reihe. Dennoch sind die Zeitunterschiede bei beiden Ansätzen deutlich genug um von einer Überlegenheit des Carvacrolöls (Cve) gegenüber der Kombination (CT) sprechen zu können.

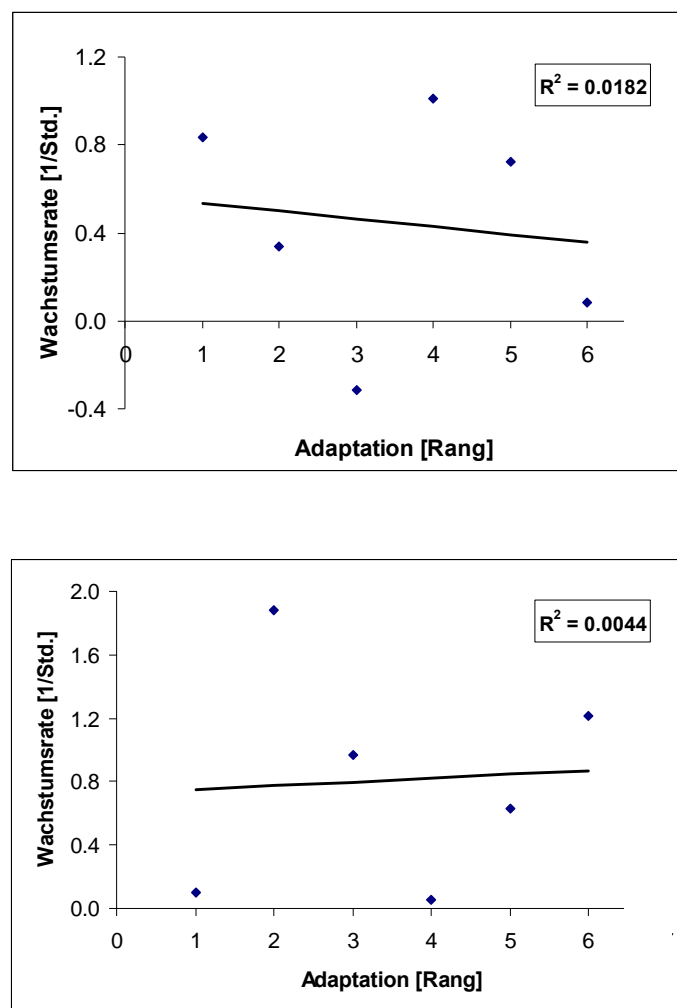
Der synergistische Effekt scheint auf direkten oder indirekten Interaktionen mit Stoffen des ätherischen Öl zu beruhen, die keine oder nur unbedeutende eigene antimikrobielle Aktivität besitzen und nur in verhältnismässig geringen Konzentrationen im ätherischen Öl vertreten sind.

Kombination	Konzentration	Absterbekinetik	Synergismus
AcII.1.Lot3	300 µg/ml:	Cve ≈ CT	<b>0</b>
	600 µg/ml:	Cve > CT	<b>Δt = 1¾ Std.</b>
AcII.2.Lot3	300 µg/ml:	Cve > CT	✓
	600 µg/ml:	Cve > CT	<b>Δt &gt; 6 Std.</b>
AcIII.1.Lot3	200 µg/ml:	Cve ≈ CTL	<b>0</b>
	400 µg/ml:	Cve > CTL	✓
AcIII.2.Lot3	400 µg/ml:	Cve > CTL	✓
	600 µg/ml:	Cve > CTL	✓
AcIII.3.Lot2	400 µg/ml:	Cve > CTL	✓
	600 µg/ml:	Cve > CTL	✓
AcIII.4.Lot3	400 µg/ml:	Cve > CTL	✓
	800 µg/ml:	Cve ? CTL	?

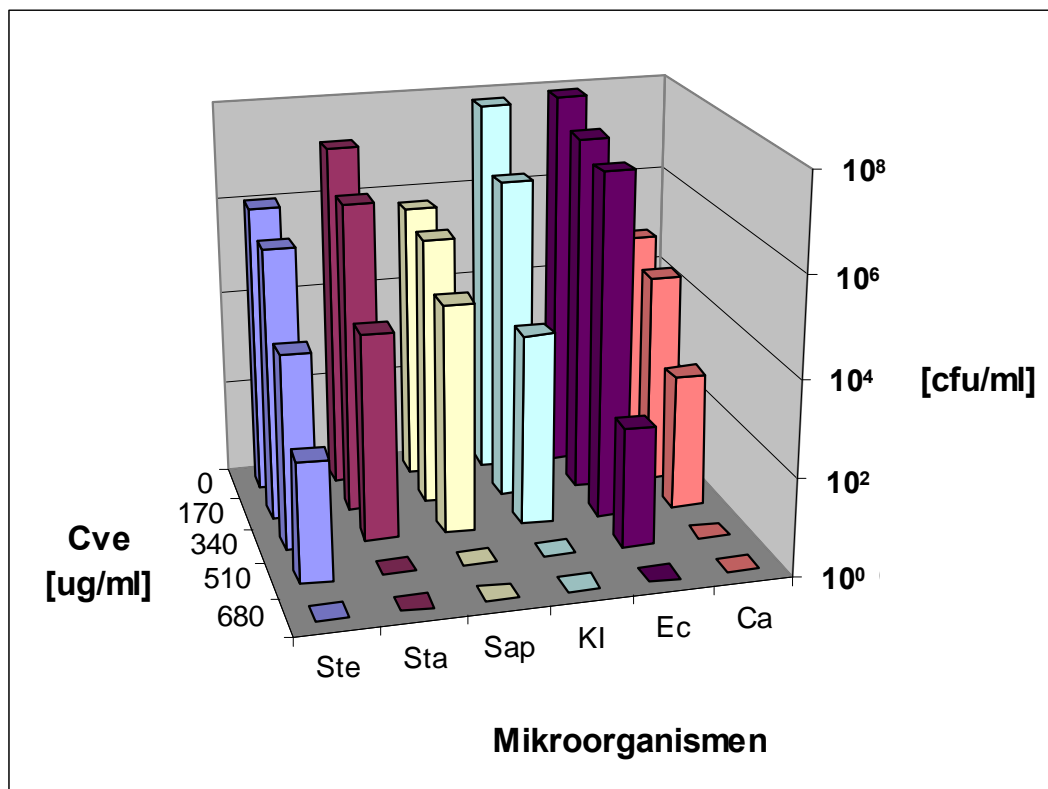
**Tab. 24:** Zusammenfassung der TKC-Ergebnisse mit den artifiziellen Kombinationen (Ac). CT: Carvacrol + Thymol; CTL: Carvacrol + Thymol + Linalool.

## 8.5 Adaptationsversuche

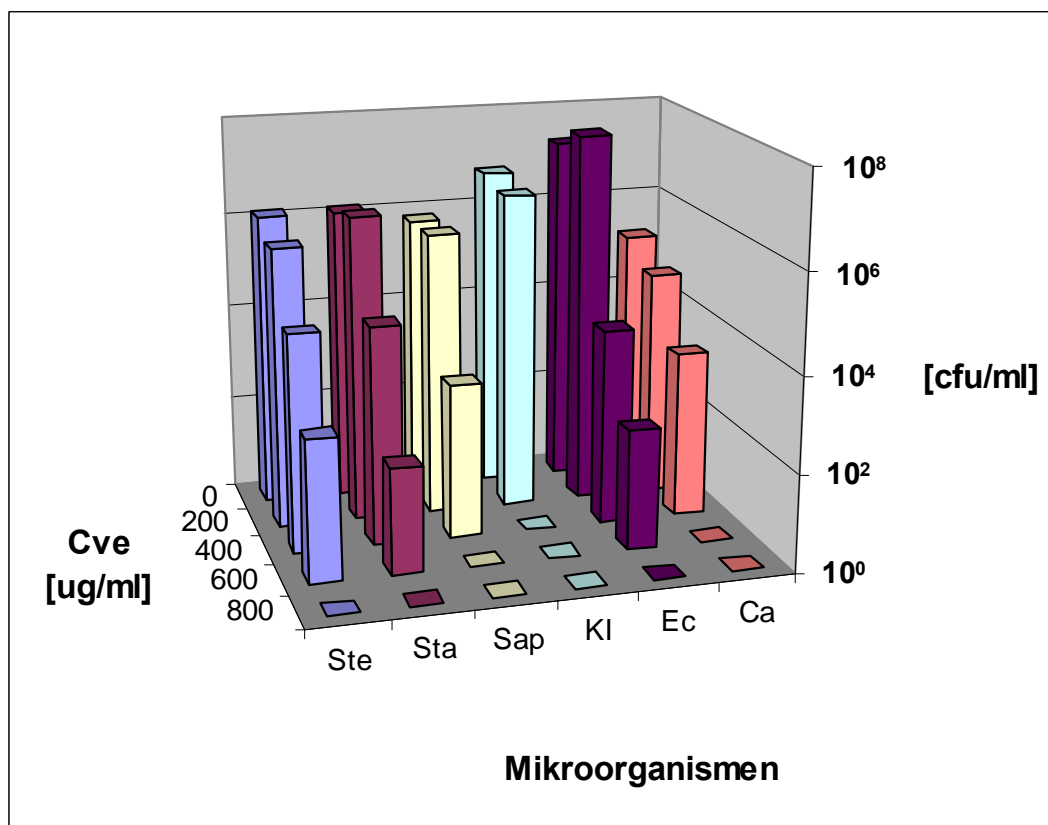
Ausgehend von subletalen Dosen ätherischen Öls (170 und 200 [ $\mu\text{g/ml}$ ]) wurde in Abständen von je zwei Stunden, die Dosis ätherischen Öls um die jeweilige Initialdosis erhöht. Die Anpassungsleistungen unterschieden sich zwischen den sechs untersuchten Keimen nicht gravierend. Keiner der Keime vermochte sich an eine vierfache Erhöhung der Initialdosis zu adaptieren (Abb. 56 & 57). Die Intervalle der Konzentrationssteigerung waren mit zwei Stunden relativ kurz. Deshalb drängte sich die Frage auf, ob es einen Zusammenhang zwischen der Wachstumsrate und der Adaptationsleistung gibt. Eine Nullkontrolle, die mitgeführt wurde, diente der Berechnung der Wachstumsrate. Die Wachstumsrate erreichte nach ca. 3 Stunden das Maximum. Es wurde eine Rangliste des Adaptationsvermögens erstellt, die sich an der erreichten Konzentration und bei gleich hoher Konzentration an der Keimzahl der Überlebenden orientierte. Es konnten keine Zusammenhänge zwischen dem Adaptationsvermögen und der Wachstumsrate gefunden werden (Abb. 55).



**Abb. 55:** Zwischen dem Adaptationsvermögen und der Wachstumsrate besteht kein Zusammenhang.



**Abb. 56:** Anpassungsvermögen an steigende Konzentrationen von Carvacrolöl (Cve).



**Abb. 57:** Anpassungsvermögen an steigende Konzentrationen von Carvacrolöl (Cve).

### 8.5.1 Rückadaptation

Als rückadaptierte Keime wurden Übernachtskulturen adaptierter Keime bezeichnet, die 24 Stunden bei 37°C in Ätherischöl freiem MH-Medium inkubiert wurden. Anschliessend wurden MHK-Tests durchgeführt und die gemessenen Werte mit den MHK-Werten der Keime vor der Adaptation verglichen. Es zeigte sich, dass die Keime nach einer einmaligen Übernachtskultur in Ätherischöl freiem MH-Medium wieder die ursprüngliche Empfindlichkeit aufwiesen (Tab. 25).

Carvacrolöl (Cve)		MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]				
Mikroorganismen	Ste	Sta	Sap	KI	Ec	Ca
vor Adaptation	625	312	312	156	312	156
nach Adaptation	625	312	312	156	312	156
Differenz	0	0	0	0	0	0

Carvacrolöl (Cve)		MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]				
Mikroorganismen	Ste	Sta	Sap	KI	Ec	Ca
vor Adaptation	250	62.5	125	125	250	125
nach Adaptation	250	125	125	110	250	125
Differenz	0	-62.5	0	15	0	0

**Tab. 25:** MHK-Werte vor und nach der Adaptation an steigende Konzentrationen ätherischen Öls. Nach Adaptation heisst, dass die Keime, die die höchst mögliche Dosis überlebt haben, während 24 Std. in Ätherischöl freiem Medium kultiviert wurden. Nach 24 Std. war kein Unterschied in der MHK im Vergleich zu nicht adaptierten Keimen zu beobachten.

## 9 Diskussion

### 9.1 Kombinationswirkungen - Zum Stand der Forschung

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden zur Untersuchung von Kombinationswirkungen, die Checkerboard-Methode und die Time-Kill-Methode, sind im Bereich der Antibiotikaforschung weitgehend etabliert [23,59-60]. In den Forschungsbereichen, die sich mit Phytopharmaka beschäftigen, ist das Interesse an Kombinationswirkungen vergleichsweise bescheiden und die beiden Methoden zur Erforschung von Kombinationswirkungen werden wenig systematisch sondern überwiegend punktuell und fragmentarisch eingesetzt. Obwohl Phytopharmaka als Vielstoffgemische ein grosses Interaktionspotenzial besitzen, liegen zurzeit nur vereinzelte Studien zu Kombinationswirkungen vor [6,68-70]. Kombinationswirkungen stehen dabei selten im Zentrum der Fragestellung. Meistens werden die Methoden zur Evaluierung von Kombinationswirkungen nur am Rande und im Rahmen anderer Fragestellungen eingesetzt. Die Beschreibung der Methoden bleibt dabei oft sehr vage und die Interpretation der Resultate ist trotz den Bemühungen internationaler Fachzeitschriften einheitliche Grenzwerte für Synergismus und Antagonismus einzuführen [21] nach wie vor der Willkür der Autoren ausgesetzt. All zu oft wird schon eine geringfügige Abweichung von einer rein additiven Wirkung als synergistische Wirkung bezeichnet. Solche Aussagen sind weder für den Kliniker noch für den Grundlagenforscher hilfreich. Allein schon die Tatsache, dass Messwerte praktisch immer Streuungen aufweisen, macht solche geringfügigen Abweichungen zu Zufallstreffern. Hinzu kommt, dass Kontroll-Ansätze (Sham-Assays), die praktisch zum Standard jeder naturwissenschaftlichen Disziplin gehören, kaum je durchgeführt werden, weder bei der Checkerboard-Methode [71] noch bei der Time-Kill-Methode [72]. Die beiden Methoden, die bislang hauptsächlich im Bereich der Antibiotikaforschung eingesetzt wurden, werden in der Regel unkritisch und ohne weitere Abklärungen für Versuche mit ätherischen Ölen übernommen. Darüber hinaus taucht in der Fachliteratur immer wieder eine Diskussion über die grundsätzliche Vergleichbarkeit der Checkerboard-Methode und der Time-Kill-Methode auf, die bisher mehr Verwirrung stiftete als Klarheit schaffte [73-75].

In Anbetracht dieser unbefriedigenden Situation im Bereich der Kombinationsforschung mit Phytopharmaka, wurde in der vorliegenden Arbeit ein systematisches Vorgehen ausgearbeitet, das insbesondere die Verwendung der ChM betrifft, das aber auch die TKM mit einbezieht und die Stärken und Schwächen der beiden Methoden berücksichtigt.

## 9.2 Methodische Ergänzungen zur Checkerboard-Methode

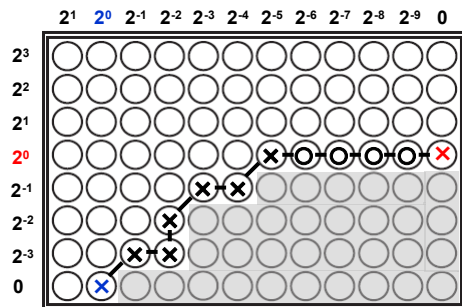
Die Checkerboard-Methode liefert eine Reihe von Messpunkten mit unterschiedlichen Bedeutungen. Es gibt MHK-Werte der Einzelstoffe und der Kombinationen. In den Randbereichen mit extremen Mischungsverhältnissen tauchen oft Messpunkte auf, die ausschliesslich die Wirkung des höher konzentrierten Stoffes repräsentieren. Solche Messpunkte sind für die statistische Auswertung irrelevant. Bei den Messwerten des ChA handelt es sich stets um diskontinuierliche Werte. Es gibt deshalb Messpunkte deren Berücksichtigung zu einem grösseren Fehler führt als ihr Ausschluss von der Berechnung. Diese Fehler sind in der Regel klein und beeinflusst das Ergebnis der statistischen Auswertung nur geringfügig. Um eine ausreichende Anzahl an Messpunkten für eine statistische Auswertung zu erhalten, sollte ein möglichst breiter Mischungsbereich untersucht werden. Gleichzeitig wird dabei der relevante Mischungsbereich ermittelt in dem die Interaktionen auftreten. Letzteres ist insbesondere für die klinische Praxis von Bedeutung. Bei der Optimierung eines Mischungsverhältnisses gilt es sowohl die Vorteile (Hauptwirkung) als auch die allfälligen Nachteile (Nebenwirkungen) zu berücksichtigen. Eine optimale Situation liegt dann vor, wenn sich die Hauptwirkung synergistisch steigern lässt und die Nebenwirkungen gleichzeitig antagonistisch abnehmen. Mischungen, die ihre synergistischen und/oder antagonistischen Wirkungen nur in einem ganz bestimmten Mischungsverhältnis entfalten, treten praktisch nicht auf. Solche Mischungen wären auch kaum praxistauglich, denn schon geringste Unterschiede in der Pharmakokinetik der beteiligten Stoffe würde das Mischungsverhältnis stören und die synergistische bzw. antagonistische Wirkung ginge verloren.

Im Folgenden werden die wichtigsten Punkte, die im Methodenteil ausführlich beschrieben werden, zusammengefasst.

### Auswertung des Checkerboard-Assay

- 1) **Messpunkte:**  
Bestimmen der relevanten Messpunkte
- 2) **FICI:**  
Berechnung des FICI
- 3) **Isobologramm:**  
Darstellung der relevanten Messwerte im Isobologramm:  
Falls Trend erkennbar → Trendlinie einfügen
- 4) **Konfidenzintervalle:**  
Konfidenzintervalle der gepoolten FICI-Werte berechnen ( $n \geq 12$ )

# Übersicht zur Auswertung des Checkerboard-Assay



## 1) Messpunkte:

**x** = MHK<sub>A</sub>

**x** = MHK<sub>B</sub>

**x** = MHK<sub>AB</sub>

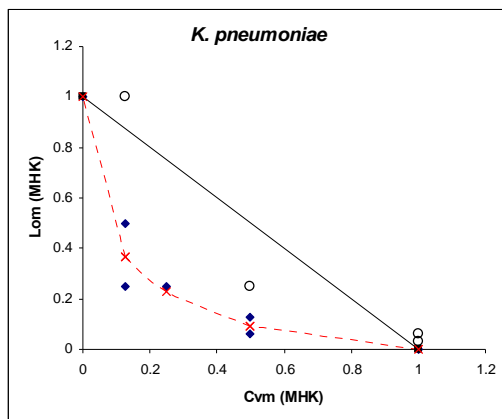
○ = irrelevante Messpunkte

Cve/Loe	[Cve]	[Loe]	Ck/Ca	Lk/La	FICI	n
1 / 0	156	0	1	0	<b>1</b>	
7.800	78	10	0.5000	0.0080	<b>0.508</b>	1
3.900	78	20	0.5000	0.0160	<b>0.516</b>	2
1.950	78	40	0.5000	0.0320	<b>0.532</b>	3
...	...	...	...	...	...	...
0.064	20	312	0.1282	0.2496	<b>0.378</b>	8
0.032	20	625	0.1282	0.5000	<b>0.628</b>	9
0.016	10	625	0.0641	0.5000	<b>0.564</b>	10
0 / 1	0	1250	0	1	<b>1</b>	

## 2) FICI-Werte:

- Tabellarische Erfassung der Messwerte

- Berechnung des FICI



## 3) Isobologramm:

- Darstellung der Messpunkte im Isobologramm

⇒ ist ein Trend erkennbar?

⇒ ev. Trendlinie einfügen

## Kombinationen des Carvacrol- und Linaloolöls:

MO: Kombi.	Konfidenzintervall	Effekt
Ste: Cve & Loe	0.75 – <b>0.92</b> – 1.09	rein additiv
Sap: Cve & Loe	0.56 – <b>0.64</b> – 0.72	überadditiv
Kl: Cve & Loe	0.46 – <b>0.51</b> – 0.56	partiell synergistisch
Ec: Cve & Loe	0.64 – <b>0.74</b> – 0.85	überadditiv
Ca: Cve & Loe	0.59 – <b>0.68</b> – 0.76	überadditiv

## 5) Konfidenzintervalle:

- Bei Vorliegen eines Trends: Konfidenzintervalle (95%), der gepoolten FICI-Werte berechnen (n ≥ 12).

⇒ Sham-Assays:  $H_0: \mu_0 = 1.0$

⇒ Synergismus:  $H_0: \mu_0 = 0.5$

**Tab. 26:** Übersicht zur Auswertung eines Checkerboard-Assay.

### 9.2.1 Interpretation der Checkerboard-Ergebnisse

Die Checkerboard-Methode ist mit wenig zeitlichem Aufwand und Material durchführbar. Pro Ansatz werden mehrere Mischungsverhältnisse getestet und es lassen sich problemlos mehrere Ansätze gleichzeitig durchführen. Aus diesem Grund ist der Checkerboard-Assay die Methode der Wahl, wenn es darum geht, stoffliche Kombinationswirkungen ausfindig zu machen. Die Time-Kill-Methode, die wesentlich aufwändiger ist, kommt erst an zweiter Stelle. Sie liefert ein differenzierteres Bild der antimikrobiellen Aktivität als die Checkerboard-Methode, weil mit ihr aufgrund der Intervallmessungen die Absterbekinetik erfasst werden kann.

Die partiell überadditiven Effekte, die mit den Kombinationen Carvacrol & Linalool sowie mit Thymol & Linalool in Gegenwart von *K. pneumoniae* erzielt wurden, waren gut reproduzierbar. Der Mittelwert der FICI lag stets im Bereich des Grenzwertes für Synergismus ( $FICI = 0.5$ ) und das Konfidenzintervall enthielt mit wenigen Ausnahmen diesen Grenzwert. Deshalb wird diese Interaktion hier als eine partiell synergistische Interaktion bezeichnet, einem Terminus, der in der klinischen Praxis wenig zur Entscheidungsfindung beiträgt und deshalb geflissentlichst vermieden werden sollte, im Rahmen der vorliegenden Fragestellungen aber sehr wohl hilfreich ist.

Auffällig ist, dass in keinem einzigen Fall auch nur in Ansätzen eine antagonistische Interaktion beobachtet werden konnte. Es treten offensichtlich keine kompetitiven Hemmungen auf, oder Hemmungen durch Bindungen mit geringer intrinsischer Aktivität. Das primäre Ziel der Monoterpene ist vermutlich die Membran, die zu gross ist, um eine limitierte Ressource darzustellen. So ist es möglich, dass unterschiedliche Monoterpene auf unterschiedliche Weise und in unterschiedlicher Intensität am gleichen Target, der Cytoplasmamembran, angreifen, ohne sich gegenseitig zu behindern, vielmehr scheinen sie sich gegenseitig den Weg in oder durch die Membran zu erleichtern.

Die Messwerte der Sham-Kontrollen dürften eigentlich nur wenig um die Indifferenzlinie streuen. Alle Messwerte lagen jedoch stets unterhalb der Indifferenzlinie. Da die Resultate der Sham-Assays Trends in Richtung additiver Wirkung aufwiesen, entsprechen sie falsch-positiven Ergebnissen. Trotz dieses indirekten Hinweises auf einen möglichen systematischen Fehler, konnte kein solcher Fehler entdeckt werden. Eine mögliche Erklärung wäre eine Verschleppung der ätherischen Öle beim Pipetieren, da die ätherischen Öle leicht am Material der Pipettenspitzen haften bleiben, wodurch sich die Konzentrationen in den Wells in Pipettierrichtung verschieben könnten. Auch die Randeffekte waren deutlich ausgeprägt, was eher typisch für Mischungen ohne Interaktionen ist. Drei potentielle Fehlerquellen könnten einen Teil der relativ grossen Streuung erklären: Zum einen die vier Pipetierschritte, die zum Beladen der Mikrotiterplatten erforderlich sind; die geringe Löslichkeit der



ätherischen Öle und in diesem Zusammenhang die hohe Anfangskonzentrationen, die gewählt werden mussten, um die Verdünnungsreihen überhaupt erstellen zu können.

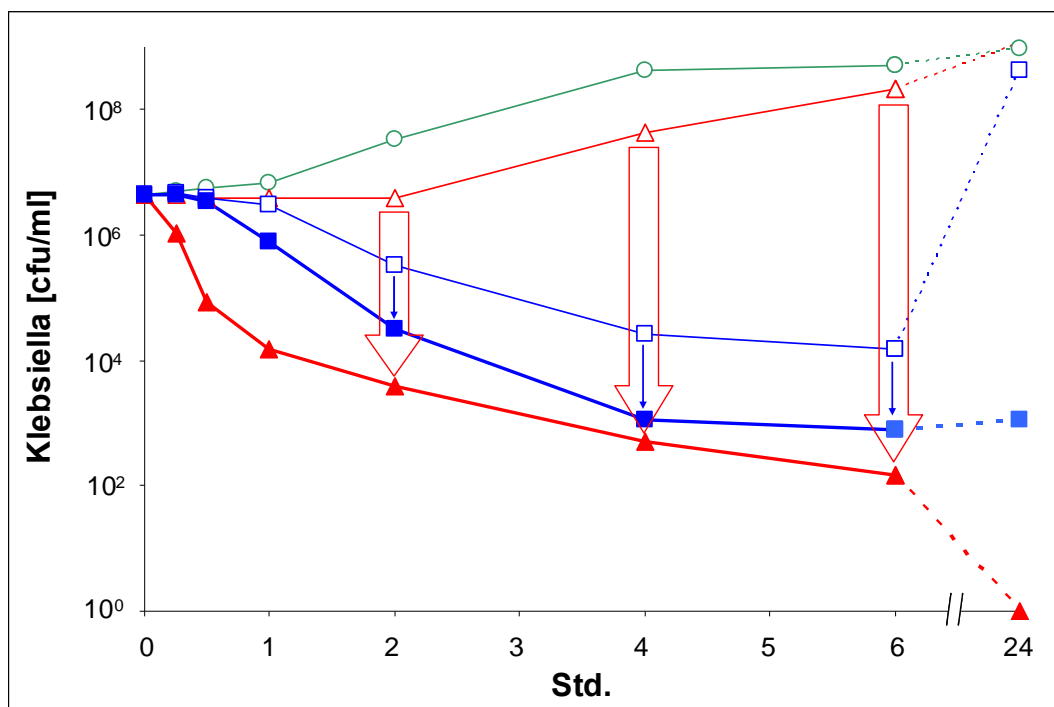
Auffällig sind die "Randeffekte", die besonders dann auftauchen, wenn keine Interaktionen auftreten. Sobald eine Kombination tendenziell überadditive Effekte aufweist, verschwinden die Randeffekte oder sie reduzieren sich auf wenige Fälle mit extremen Mischungsverhältnissen, die in den Isobologrammen kaum hervortreten, weil sie praktisch mit den MHK-Punkten zusammenfallen. Bestehen jedoch keinerlei Tendenzen zu überadditiven Effekten, manifestiert sich das Randphänomen auch bei relativ ausgeglichenen Mischungsverhältnissen. Diese Randpunkte müssen aus der Berechnung ausgeschlossen werden, denn sie liegen in einem Mischungsbereich, in dem keine Interaktionen stattfinden.

Inwieweit die Checkerboard-Methode klinisch relevante Interaktionen nicht erfasst, ist und bleibt vorerst ein Thema, zu dem es wohl noch weitere Untersuchungen und Publikationen braucht. Die mit der Checkerboard-Methode gefundenen Synergistischen Effekte dürften vor dem Hintergrund der klinischen Relevanz tendenziell wohl eher überschätzt werden. Die Checkerboard-Methode steht deshalb durchaus am richtigen Platz, wenn sie am Anfang von Kombinationsexperimenten steht.

## **9.2.2 Interpretation der Time-Kill-Ergebnisse**

Die Time-Kill-Methode liefert durch die Erfassung der Keimzahl in definierten Zeitintervallen ein dynamisches Bild der antimikrobiellen Aktivität. Der zeitliche Verlauf der Absterberate brachte Eigenschaften der ätherischen Öle zum Vorschein, die bei der Checkerboard-Methode verborgen blieben. Im Gegensatz zu den Resultaten der Checkerboard-Assays, bei denen nur partiell synergistische Effekte beobachtet werden konnten, traten bei der Time-Kill Methode tatsächlich synergistische Effekte auf. Diese Asymmetrie wird auch in der Literatur beschrieben [73] und beruht in erster Linie auf den unterschiedlichen Messverfahren der beiden Methoden. Bei der ChM bildet die MHK, die durch eine visuelle Beurteilung der Trübung erhalten wird, die Grundlage der Berechnung. Bei der TKM dagegen bildet die Keimdichte, die mittels Verdünnungsreihen bestimmt wird, die Grundlage der Berechnung, was eine wesentlich empfindlichere Methode ist (siehe Kap. 9.2.3). Das "Konzentrationsfenster" in dem sich synergistische Effekte manifestieren ist sehr klein. Nur in einem Konzentrationsbereich zwischen 300 µg/ml bis 600 µg/ml konnten die synergistischen Effekte beobachtet werden. Bei tieferen Konzentrationen bleibt die antimikrobielle Wirkung aus und bei höheren Konzentrationen stösst die Methode an die Grenzen der zeitlichen Auflösung. Es spricht jedoch nichts dagegen anzunehmen, dass dieser synergistische Effekt auch bei höheren Konzentrationen (grundsätzlich) erhalten bleibt.

Die eigentliche Stärke der ätherischen Öle ist die ausserordentlich hohe Absterberate, die einsetzt, sobald die Konzentration des ätherischen Öls etwa das 1,4-fache der MHK erreicht (Abb. 57). Der 1,4-fache MHK-Wert entspricht den MBK-Werten für Cve, Cvm und Loe. Der MBK-Wert für Thm liegt beim 1,8-fachen MHK-Wert. Einzig bei Lom musste die Konzentrationen im Durchschnitt um das 3,4-fache erhöht werden, um die MBK zu erreichen. Die hohe Absterberate bei Überschreiten der MHK konnte auch bei *Staph. epidermidis*, *E. coli* und *C. albicans* (Abb. 44, 45, 47) beobachtet werden. Eine Verdoppelung der MHK führte innerhalb von 15 bzw. 30 Minuten zu einem Absterben der Keime. Vergleichbar hohe Absterberaten fanden May et al. (2000) [72] bei *Klebsiella pneumoniae* und *Enterococcus faecium* in Gegenwart von Teebaumöl.



**Abb. 58:** Eine Verdoppelung von 1-MHK auf 2-MHK erhöht die Absterberate beim Carvacrolöl wesentlich stärker als beim Antibiotikum Gentamycin (○ 0-Kontrolle, □ 1-MHK-Gm, ■ 2-MHK-Gm, △ 1-MHK-Cve, ▲ 2-MHK-Cve).

Die synergistische Wirkung des Carvacrolöls, die mit Hilfe der artifiziellen Kombinationen und der Time-Kill-Methode entdeckt wurde, beruht auf einer Beschleunigung der Absterberate, die unmittelbar nach der Applikation des Öl einsetzt und innert kurzer Zeit zu einem vollständigen Absterben der Keime führt. Es ist diese Eigenschaft des Carvacrolöls die besonders hervorgehoben werden muss und die eine rationale Begründung insbesondere für äusserliche Anwendungen des Öls als Vielstoffgemisch liefert.

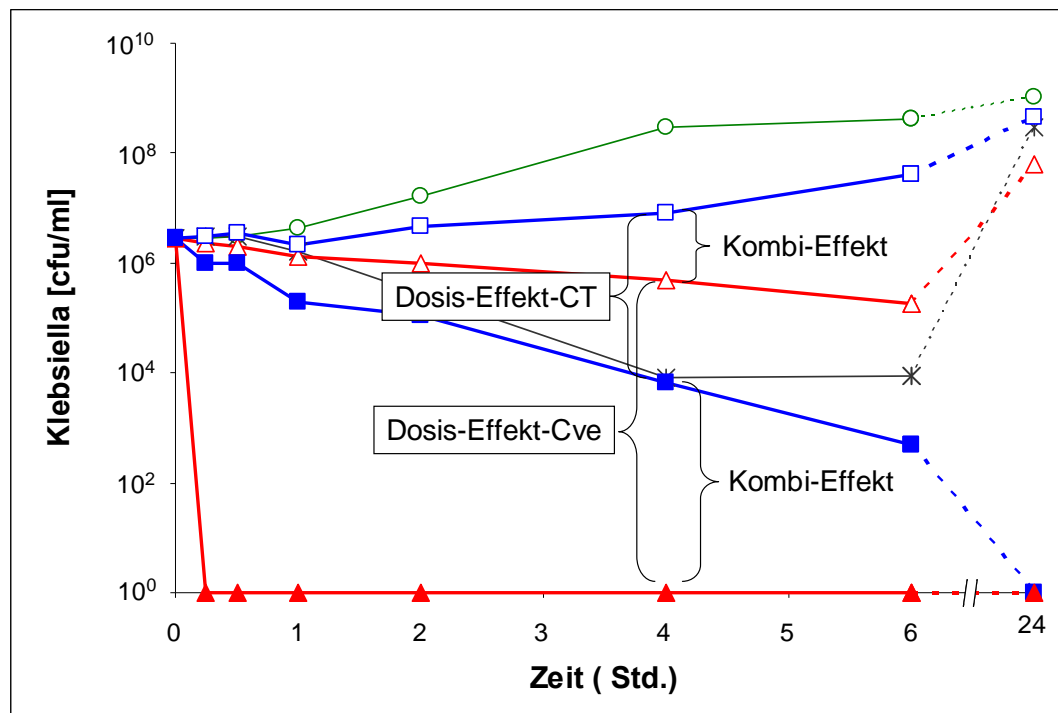
### 9.2.3 Artificielle Wirkstoffkombinationen im TK-Assay

Um herauszufinden inwieweit die restlichen (unwirksamen) Komponenten ( $R_i$ ) zur antimikrobiellen Aktivität des Carvacrolöls beitragen, wurden artificielle Kombinationen hergestellt. Diese artificielle Kombinationen setzten sich aus den zwei (CT) bzw. drei (CTL) Wirkstoffen zusammen. Die Mischungen der artificielle Kombinationen wurden so gewählt, dass sie den Konzentrationen des nativen Carvacrolöls entsprachen. Es handelte sich bei den artificielle Kombinationen im Grunde genommen also um artificielle Fraktionen des nativen Öls. Es zeigte sich, dass das Carvacrolöl (Cve) der Dreierkombination (CTL) überlegen war und die Dreierkombination (CTL) der Zweierkombination (CT), wie aus Tabelle 23 für die Messwerte bei 600  $\mu\text{g/ml}$  für Cve, CTL und CT ersichtlich ist. Neben den Hauptwirkstoffen Carvacrol, Thymol und Linalool müssen noch weitere Inhaltsstoffe an der antimikrobiellen Wirkung des Carvacrolöls beteiligt sein. Dabei handelt es sich offensichtlich um Inhaltsstoffe, die keine oder nur eine unbedeutende eigene antimikrobielle Aktivität besitzen und nur in verhältnismässig geringen Konzentrationen im ätherischen Öl vertreten sind. Hinzu kommt, dass alle Dosiserhöhungen beim Carvacrolöl stets einen grösseren Effekt hatten als bei den artificielle Kombinationen. Eine Erhöhung der Dosis von 300  $\mu\text{g/ml}$  auf 600  $\mu\text{g/ml}$  wirke sich bei Cve stärker aus als bei CTL bzw. CT (Abb. 40-52). Mit steigenden Konzentrationen hat stets auch der Kombinationseffekt zugenommen (Abb. 59).

Der synergistische Effekt manifestierte sich in erster Linie in einer beschleunigten Absterberate. Mit der Checkerboard-Methode wird dieser Effekt, der sich innerhalb von 24 Stunden abspielt, oft nicht erfasst. Besonders deutlich werden die Unterschiede der Absterberaten zwischen dem Carvacrolöl und den artificielle Kombinationen bei denjenigen Ansätzen, die gemäss Definition keine synergistische Wirkung haben (Tab. 24). Durch [600  $\mu\text{g/ml}$ ] Carvacrolöl wird das Inokulum innerhalb von 15 Minuten vollständig abgetötet, die artificielle Kombinationen benötigen dafür 2 Stunden (AcII.1) bzw. mehr als 6 Stunden (AcII.2).

Es ist der differenzierten zeitlichen Auflösung der Time-Kill-Methode zu verdanken, dass diese Unterschiede aufgedeckt wurden. Die Unterschiede mögen klinisch irrelevant sein, doch bestätigen sie die potentielle Überlegenheit des Vielstoffgemisches Carvacrolöl gegenüber der artificielle Kombination, die nur aus den Hauptwirkstoffen besteht. Darf man daraus nun schliessen, dass in der Natur bereits die optimalen Kombinationen vorliegen, im Sinne von «nature knows best»? Nein! Wie bereits gezeigt, liegt das Mischungsverhältnis im Carvacrolöl ausserhalb jenes Verhältnisses in dem partieller Synergismus beobachtbar war. Auch für die Pflanze scheint eine weitere Optimierung der Zusammensetzung des ätherischen Öls keinen selektiven Vorteil zu bringen. Mit Hilfe der Kombinationsforschung könnten durchaus synergistisch wirkende Kombinationen gefunden werden, die natürlichen Kombinationen überlegen

sind und deren synergistische Effekte gross genug sind, um klinisch relevant zu sein.



**Abb. 59:** Die Erhöhung der Dosis von 300 µg/ml auf 600 µg/ml hatte bei Cve den grösseren Effekt als bei der artifiziellen Kombination CT (Dosis-Effekt). ○ 0-Kontrolle, \* Gm 0.5 µg/ml, □ CT 300 µg/ml, ■ CT 600 µg/ml, △ Cve 300 µg/ml, ▲ Cve 600 µg/ml

#### 9.2.4 Vergleichbarkeit der Checkerboard- & Time-Kill-Methode

In den Jahren 1979-81 wurde in wissenschaftlichen Fachjournalen heftig darüber debattiert, ob die beiden am häufigsten verwendeten Methoden zur Bestimmung von Synergismus und Antagonismus, die Checkerboard-Methode (ChM) und die Time-Kill-Methode (TKM), vergleichbare Resultate liefern, oder ob Birnen mit Äpfeln verglichen werden (Greenwood, Norden, Moellering, Berenbaum [73-76]). Oft stimmen die Resultate der beiden Methoden zwar überein, doch treten auch immer wieder Fälle mit widersprüchlichen Ergebnissen auf. Insbesondere wird in Publikationen, die sich dieser Frage widmen, auf eine gewisse Asymmetrie der beiden Methoden hingewiesen. Lässt sich mit der ChM Synergismus nachweisen, so lässt sich in der Regel auch mit der TKM Synergismus nachweisen. Der umgekehrte Fall soll jedoch wesentlich seltener auftreten. Norden unternimmt den Versuch die beiden Methoden miteinander zu vergleichen [73]. Er benutzt dazu drei unterschiedliche Kriterien zur Bestimmung der Checkerboard Synergie und wundert sich über inkonsistente Ergebnisse. Nun vergleicht er die inkonsistenten Ergebnisse mit Resultaten der Time-Kill Methode und erhält wieder inkonsistente Resultate. Er fragt sich sogar, ob die beiden Methoden dass gleiche Phänomen erfassen.

White et al. (1996) [77], der die Vergleichbarkeit der drei Methoden (TKM, ChM und E-Test) untersuchte, hat sogar gegensätzliche Ergebnisse erhalten. Abschliessend hält er fest, dass die beiden Methoden zwar nicht austauschbar sind, die Ergebnisse aber häufig übereinstimmen.

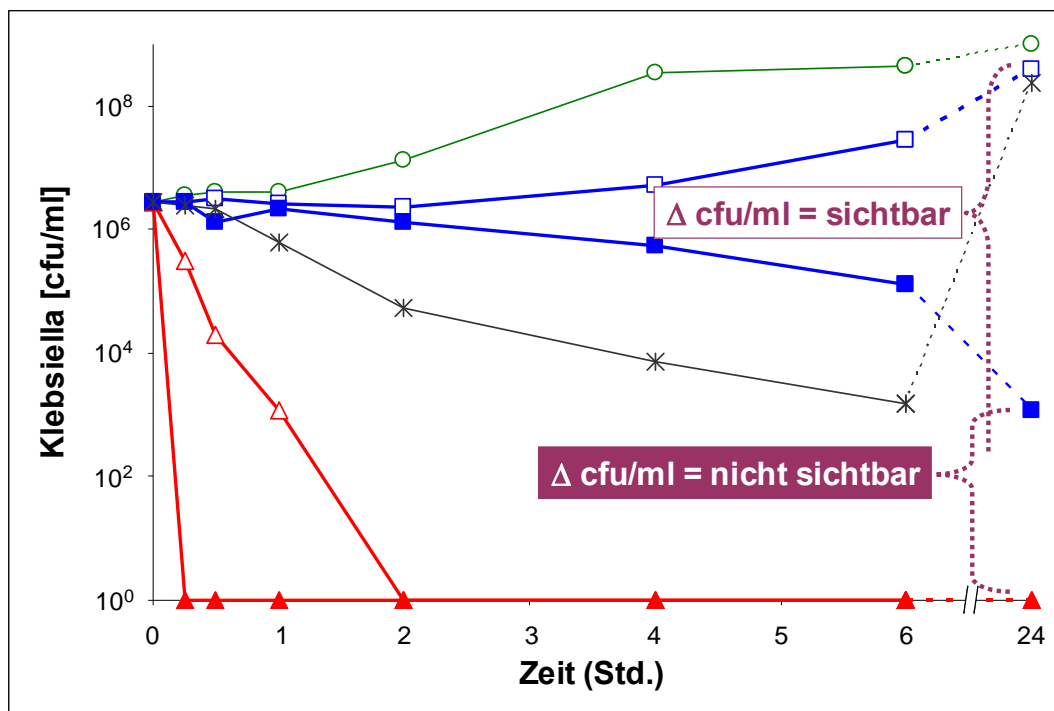
Vor diesem Hintergrund sollen an dieser Stelle ein paar grundsätzliche Überlegungen zur Vergleichbarkeit der beiden Methoden angestellt werden. Bei der Time-Kill-Methode wird die Keimdichte mittels Verdünnungsreihen zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. Die Bestimmung der Keimdichte ist wesentlich genauer als die visuelle Beurteilung der Trübung (ja/nein) der Zellen einer Mikrotiterplatte, wie dies bei der Checkerboard-Methode zur Bestimmung der MHK üblich ist. Eine Keimdichte von  $10^6$  cfu/ml oder kleiner lässt sich in der Regel visuell nicht mehr als Trübung erkennen. Somit sind auch Unterschiede der Keimdichte unterhalb von  $10^6$  cfu/ml nicht mehr erfassbar. Schon aus diesem Grund vermag die TK-Methode noch synergistische Effekte aufzudecken, wo eine visuelle Differenzierung mit der Checkerboard-Methode längst nicht mehr möglich ist (Abb. 60). Es werden viele methodische Mängel aufgeführt, die der Vergleichbarkeit abträglich sein sollen aber seltsamerweise kommt dieser prinzipielle Unterschied nie zur Sprache.

Bei der ChM liegt ein synergistischer Effekt vor, wenn der berechnete FICI-Wert  $\leq 0.5$  ist. Bei der TKM liegt Synergismus vor, wenn die Kombination (A+B) das Inokulum nach 24 Stunden um mehr als das 100-fache ( $\text{mal } 10^{-2}$ ) reduziert hat, im Vergleich zur aktiveren der beiden Monosubstanzen (A oder B) [60]. Mit FICI-Werten können synergistische Effekte quantifiziert werden, mit der TK-Definition sind nur entweder/oder Entscheide möglich. Ein Vergleich der beiden Methoden zeigt, dass sie sich auf allen Stufen, von der Definition über die Messung bis zur Berechnung für Synergismus deutlich voneinander unterscheiden (Tab 27). Die Ergebnisse der beiden Methoden entziehen sich somit einem unmittelbaren Vergleich.

Obwohl mit der TKM eine präzise zeitliche Erfassung der Absterbekinetik möglich ist, klammert die Time-Kill-Definition für Synergismus das zeitliche Geschehen innerhalb der ersten 24 Stunden aus und berücksichtigt einzig und allein die Situation nach 24 Stunden. Dadurch ist zwar trotz allen Unterschieden eine gewisse Vergleichbarkeit mit der ChM gewährleistet, doch wird dadurch gerade jene Eigenschaft der ätherischen Öle ausgeblendet, die sie besonders auszeichnet, ihre ausserordentlich schnelle bakterizide Wirkung ab Konzentrationen  $\geq$  MBK. Dass dieser Zeitaspekt in der Literatur kaum zur Sprache kommt, mag daran liegen, dass vor allem über Antibiotika publiziert wird und Antibiotika erst nach einer Lag-Phase von etwa einer Stunde ihre Aktivität zu entfalten beginnen und die Absterbekinetik im Vergleich zu den ätherischen Ölen deutlich langsamer verläuft.

Allen Vorbehalten der Vergleichbarkeit zum Trotz, stimmen die Resultate der beiden Methoden in qualitativer Hinsicht gut überein. Die quantitativen

Diskrepanzen, die auftraten, verraten mehr über die Natur der Definitionen und Messungen, als über die Natur der Interaktionen.



**Abb. 60:** Unterschiede der Inokulumdichte unterhalb von 10<sup>6</sup> cfu/ml lassen sich visuell in der Regel nicht mehr erkennen. Mit Hilfe von Verdünnungsreihen können bei der TK-Methode auch optisch nicht unterscheidbare Inokuladichten bestimmt werden.

Checkerboard-Methode	Time-Kill-Methode
<b>Definition für Synergismus:</b> FICI ≤ 0.5 nach 24 Std.  Synergismus quantifizierbar: ⇒ FICI ist kardinalskaliert (stetig)	<b>Definition für Synergismus:</b> Faktor > 10 <sup>2</sup> nach 24 Std. verglichen mit der aktiveren Substanz  Synergismus nur qualifizierbar: ⇒ nominalskaliert (ja/nein)
<b>Messung:</b> MHK in µg/ml nach 24 Stunden	<b>Messung:</b> MO-Dichte in cfu/ml nach 24 Stunden
<b>Berechnung:</b> $FICI = \sum [X_k/X_a] \text{ (nach 24 Std.)}$	<b>Berechnung:</b> $\text{Faktor} = [A] / [A+B] \text{ (nach 24 Std.)}$

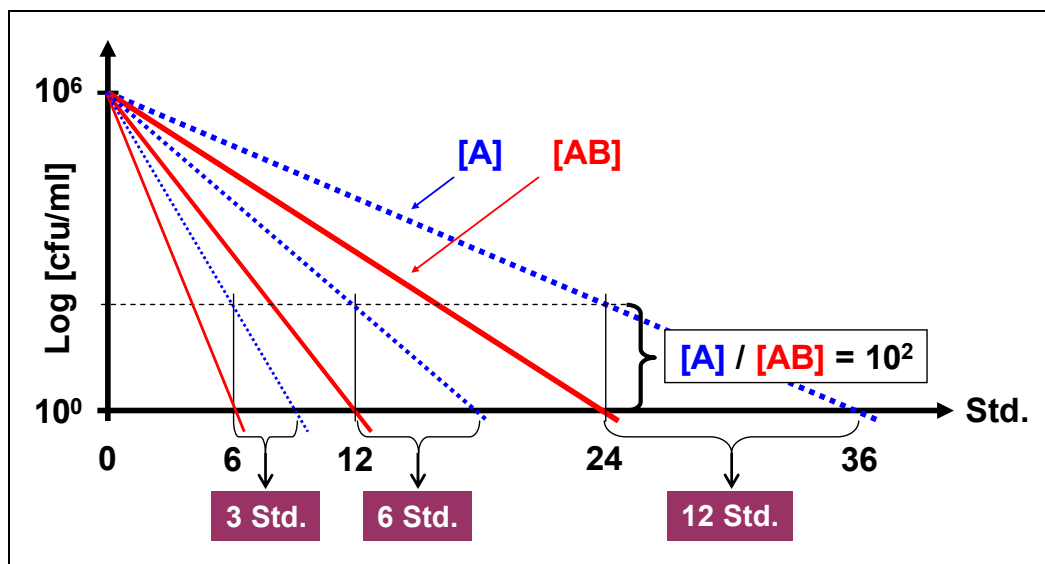
**Tab. 27:** Ein Vergleich der Checkerboard- und der Time-Kill-Methode zeigt, dass sich die beiden Methoden auf allen Stufen, von der Definition über die Messung bis zur Berechnung für Synergismus deutlich voneinander unterscheiden. Ein direkter Vergleich der beiden Methoden ist nicht möglich.

Die beiden Methoden haben nicht nur unterschiedliche Stärken und Schwächen. Unter geeigneten Umständen können sie sich durchaus sinnvoll ergänzen. Das zeigen die vorliegenden Ergebnisse. Mit der ChM wurde ein breites Spektrum unterschiedlicher Mischungsverhältnisse der aktiven Monosubstanzen untersucht und dabei ein partiell synergistischer Effekt entdeckt, der bei Anwesenheit von *K. pneumoniae* durch Interaktionen der aktiven Wirkstoffe (Carvacrol & Linalool sowie Thymol & Linalool) zustande kommt. Im Carvacrolöl liegen jedoch ganz andere Mischungsverhältnisse dieser Wirkstoffe vor. Infolgedessen tritt dieser partielle Synergismus im nativen Carvacrolöl gar nicht auf. Mit der TKM dagegen konnte in Gegenwart von *K. pneumoniae* ein synergistischer Effekt des nativen Carvacrolöls nachgewiesen werden, der auf einer Wirkstoff-Begleitstoff Interaktion beruht. Mit Hilfe der beiden Methoden gelang es, sowohl potentielle als auch aktuelle synergistische Wechselwirkungen des Vielstoffgemisches Carvacrolöl aufzudecken.

### 9.2.5 Erweiterung des Definitionsbereichs für Synergismus der TKM

Obwohl mit der Time-Kill-Methode die Absterbekinetik präzise erfassbar ist, berücksichtigt die bestehende Definition für Synergismus den Zeitaspekt der Absterbekinetik nicht, womit im Grunde genommen die wichtigste Information, die diese Methode liefert, unterschlagen wird. In Gegenwart eines Antibiotikums wird das Inokulum in den ersten Stunden oft nur wenig reduziert (Bakteriostase), weil die Absterbekinetik massgeblich von der Stoffwechselgeschwindigkeit des betreffenden Mikroorganismus bestimmt wird, in dessen Metabolismus das Antibiotikum eingreift. Beim Thymianöl dagegen setzt die antimikrobielle Aktivität praktisch sofort ein und führt bei Konzentrationen  $> \text{MBK}$  innert kürzester Zeit zu einer vollständigen Erradikation des betreffenden Mikroorganismus. Diese Eigenschaft ist nicht nur auf das Thymianöl beschränkt, wie Untersuchungen mit Teebaumöl zeigen [72]. Eine Erweiterung des Definitionsbereiches auf die ersten 24 Stunden könnte deshalb für die Synergismusforschung mit ätherischen Ölen von Nutzen sein. Aus diesem Grund wird hier eine Erweiterung des Definitionsbereiches für Synergismus bei Verwendung der TKM vorgestellt. Die Erweiterung orientiert sich an der bereits bestehenden Definition für Synergismus der TKM und setzt folgende Bedingungen voraus: Eine vollständige Erradikation ohne erneutes Aufwachsen innerhalb von 24 Stunden. Ausgangspunkt für die Erweiterung ist der gerade noch erfassbare synergistische Unterschied ( $A/AB = 10^2 \text{ cfu/ml}$ ) nach 24 Stunden Inkubation. Die graphische Darstellung in Abb. 61 veranschaulicht die Idee. Ausgehend von einem Inokulum von  $10^6 \text{ cfu/ml}$  und unter der Annahme einer linearen Abnahme des Inokulums mit der Zeit, wird der Unterschied der Keimdichte von  $10^2 \text{ cfu/ml}$  nach 24 Stunden auf die Zeitachse übertragen. Die für Synergismus erforderliche Differenz der Keimdichte von  $10^2 \text{ cfu/ml}$  nach 24 Stunden entspricht einer Zeitdifferenz von 12 Stunden, das

heisst, dass die synergistische Kombination [AB] das Inokulum 12 Stunden früher erradiziert hat als die aktivere der beiden Substanzen [A]. Je mehr man sich auf der Zeitachse dem Nullpunkt nähert, umso kleiner werden die Zeitunterschiede, wenn weiterhin von einer Differenz der Keimdichte von  $10^2$  cfu/ml ausgegangen wird. Da eine bestimmte Zeitdifferenz in unmittelbarer Nähe des Nullpunktes klinisch bedeutsamer ist als in weiter Entfernung, wird die mittlere Zeitdifferenz von 6 Stunden als Grenzwert für Synergismus innerhalb der ersten 24 Stunden bei der TKM vorgeschlagen. Es sollen dabei, nochmals in Erinnerung gerufen werden, dass nur Unterschiede zwischen vollständig erradizierten Inokula zu berücksichtigen sind. In Abb. 51 wäre Cve 600 µg/ml der artifiziellen Kombination CT 600 µg/ml synergistisch überlegen, da Cve das Inokulum mehr als 6 Stunden früher als CT erradiziert hat.



**Abb. 61:** Die für Synergismus erforderliche Differenz der Keimdichte von  $10^2$  cfu/ml nach 24 Stunden entspricht einer Zeitdifferenz von 12 Stunden. Da eine bestimmte Zeitdifferenz in unmittelbarer Nähe des Nullpunktes klinisch bedeutsamer ist als in weiter Entfernung, wird die mittlere Zeitdifferenz von 6 Stunden als Grenzwert für Synergismus innerhalb der ersten 24 Stunden bei der TKM vorgeschlagen.

### 9.3 Die klinische Bedeutung der Ergebnisse

Der extrem schnelle Eintritt der bakteriziden Wirkung ab Konzentrationen  $\geq$  MBK ist insbesondere dann von klinischer Bedeutung, wenn wenig Zeit für die Interaktion zwischen Pathogen und ätherischem Öl bleibt, wie beim Gurgeln, Inhalieren, bei Bädern und der lokalen Wundversorgung. In all diesen Fällen ist die schnelle und gründliche antimikrobielle Wirkung der ätherischen Öle eine Voraussetzung für ihre antimikrobielle Wirksamkeit.

Konzentrationen  $\geq$  MBK werden in der Praxis spielend erreicht. Für therapeutische Zwecke werden ätherische Öle bei topischer Anwendung, etwa



zu Behandlung von Mykosen oder kleiner infizierter Wunden, in der Regel in Konzentrationen von 5 – 20% Ätherischölgehalt eingesetzt. Rein theoretisch hätte man bereits bei einer Konzentration von 0.075% Carvacrolöl eine Konzentration erreicht, die gegen alle untersuchten Keime antimikrobielle Wirkung zeigt.

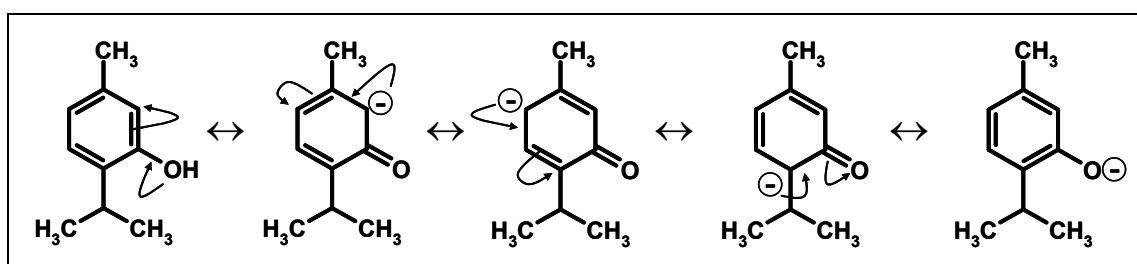
Da es sich bei den Mikroorganismen um pathologisch relevante Erreger des Menschen handelte, kann die Interaktion zwischen den Erregern und dem Thymianöl als Bestandteil des klinischen Beziehungsdreiecks: Thymianöl, Erreger, Mensch aufgefasst werden. Wenn nicht bereits klinische Erfahrungen und Untersuchungen vorliegen würden, müssten die Resultate mit Vorbehalt interpretiert werden. Doch die Ergebnisse, die hier unter in-vitro Bedingungen erzielt wurden, bestätigen vielmehr die bereits vorliegenden klinischen Erfahrungen, und bieten eine rationale Erklärung für die Wirksamkeit bei Anwendungsformen mit kurzen Einwirkzeiten, wie dies bei den äusserlichen Anwendungen des Thymianöls der Fall ist. Thymol ist bereits Bestandteil vieler Mundwässer, Gurgellösungen, Inhalationspräparaten und Salben. Umschläge mit aufgebrühtem Thymiankraut (dreifache Teedosierung) haben sich zur Hautsanierung bei MRSA-Patienten bewährt [78]. Bei der innerlichen Anwendung spielen Thymian-Extrakte die wichtigere Rolle als Thymianöle. Im Extrakt ist das ätherische Öl Bestandteil eines wesentlich komplexeren Vielstoffgemisches, das neben den Mono- und Sesquiterpenen insbesondere Flavonoide, Triterpene und Lamiaceen-Gerbstoffe enthält. Die antimikrobielle Wirkung eines Thymiantees (wässriger Extrakt) darf nicht unterschätzt werden. *Helicobacter pylori* beispielsweise reagiert auf einen wässrigen Extrakt aus Thymian empfindlicher als auf einen alkoholischen Extrakt [30]. Vielleicht wären Rollkuren mit Thymiantee eine sinnvolle begleitende Therapie oder in gewissen Fällen sogar eine Alternative zur Antibiotika-Therapie bei *Helicobacter*-Infektionen des Magens.

Hautinfektionen werden in ca. 70% der Fälle durch Staphylokokken und Streptokokken verursacht. Auch *C. albicans* ist ein häufiger Erreger von Haut- und Schleimhautinfektionen (Soor). Zur lokalen Behandlung werden häufig Fusidinsäure, Bactracin & Neomycin und Gentamycin verwendet. Auch basische Farbstoffe wie Methylviolett, Gentianaviolett oder Kristallviolett, die an Zelleinweise binden haben eine breite bakteriostatische Wirkung, insbesondere bei grampositiven Erregern. Ätherische Öle stellen eine weitere effiziente Alternative zur Behandlung von Hautinfektionen dar. Sie wirken schneller als Antibiotika, sind, im Gegensatz zu den basischen Farbstoffen, bakterizid und haben ein ausgesprochen breites Wirtsspektrum (Bakterien & Pilze). In Anbetracht der rasanten Zunahme Antibiotika resistenter Erreger, sollte bei topischer Anwendung der Einsatz von Antibiotika wenn möglich vermieden werden und alternative Verfahren und Mittel, wie ätherische Öle, zur Anwendung kommen.

## 9.4 Zur Wasserlöslichkeit von Thymol und Carvacrol

«Für alle Wirkungen von Arzneimitteln, die eine Resorption voraussetzen, ist das gleichzeitige Vorliegen von Lipid- und Wasserlöslichkeit besonders günstig. ... Die Lipidlöslichkeit besitzt, in verschiedener Hinsicht, eine grössere Bedeutung als die Wasserlöslichkeit. Sie ist eine wesentliche Voraussetzung für die Permeation der Moleküle durch biologische Membranen, also für alle Resorptions-, Penetrations- und Exkretionsvorgänge.» aus Karzel & Liedtke: Einführung in die Arzneimitteltherapie, 1985 [79].

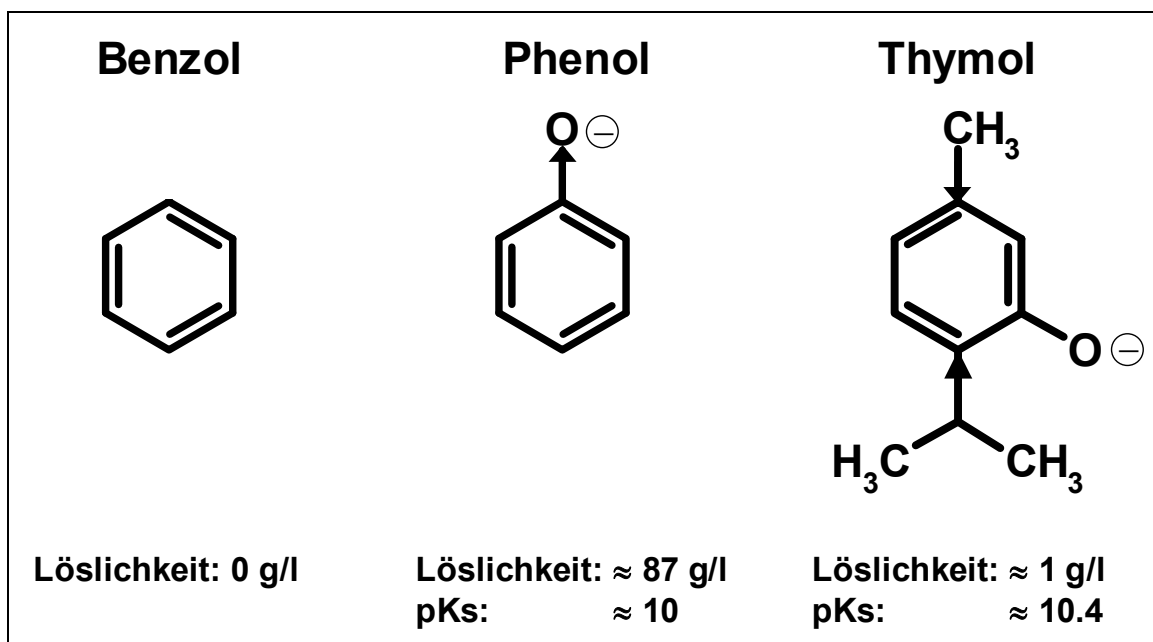
Die Löslichkeit ätherischer Öle in wässrigen Medien ist in der Regel sehr klein. Oft wird sogar behauptet ätherische Öle seien absolut unlöslich in wässrigen Medien. Es gibt leider kaum brauchbare Untersuchungen zur Löslichkeit ätherischer Öle und selbst Tabellenwerke wie der «The Index Merck: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 13th ed.» stellen keine zuverlässigen Quellen dar. Dass Thymol eine gewisse Wasserlöslichkeit besitzen soll, Carvacrol dagegen nicht, wie Cristani (2001) [80] unter Berufung auf die Merck-Tabelle behauptet, muss schon aufgrund einfacher Überlegungen angezweifelt werden. Der nur geringe Unterschied der antimikrobiellen Aktivität spricht schon gegen diese Behauptung. Weitere Hinweise, dass Carvacrol und Thymol löslich sein müssen, liefern die Mischexperimente. Kurzes Schütteln von Hand reicht aus, um die volle antimikrobielle Wirkung zu erzielen. Veldhuizen et al. (2006) [81], bestimmten die Löslichkeit des Carvacrols experimentell und konnten in Luria-Bertani-Medium eine Löslichkeit von 6.7 mM messen. Das entspricht einer Löslichkeit von ca. 0.1%, was mit dem überwiegenden Teil der Angaben zur Löslichkeit von Carvacrol übereinstimmt.



**Abb. 62:** Mesomeriestabilisierung eines Thymol Phenolat-Ions. Die Stabilität der Phenolat-Ionen ist hauptsächlich vom pH-Wert und der Anwesenheit metallischer Kationen abhängig.

Die experimentellen Messungen stimmen auch mit der grundlegenden chemischen Eigenschaften der Phenole überein, in wässrigen Medien relativ stabile Phenolate zu bilden, da das freie Elektron in den aromatischen Ring einbezogen und dadurch stabilisiert wird (Abb. 62). Diese Mesomeriestabilisierung ist jedoch abhängig von der Art der Substituenten, ihrer Stellung zur  $-\text{OH}$  Gruppe am Ring, sowie vom Medium, insbesondere vom pH-Wert und der Anwesenheit metallischer Kationen.

Die Phenylgruppen von Thymol und Carvacrol wirken sich als Elektronen-Donor-Substituenten grundsätzlich nachteilig auf die Mesomeriestabilisierung aus. Der pKs des Carvacrols und Thymols liegt aus diesem Grund etwas über dem pKs des Phenols von 10 (Abb. 63). Kishino & Kobayashi (1995) [82] konnten in ökotoxikologischen Experimenten an Fischen zeigen, dass sich die Aufnahme von Chlorphenolen in den Fischkörper erst ändert, wenn der pH-Wert des Mediums den pKs-Wert der Phenole übersteigt. Überschreitet der pH-Wert den pKs-Wert ( $\text{pH} > \text{pKs}$ ) überwiegt zunehmend die dissoziierte Form der Phenolate wodurch die Einlagerung der undissoziierten Form in die Membran abnimmt. Wahrscheinlich trifft dies ebenso für die beiden Phenole Thymol und Carvacrol zu. Das würde heissen, dass Thymol und Carvacrol im pH-Bereich unterhalb von 10 in der Lage sind, ihre volle Wirkung zu entfalten.



**Abb. 63:** Art und Stellung der Substituenten am Benzolring beeinflussen unter anderem den pKs-Wert und die Löslichkeit der phenolischen Verbindungen.

Neuere Untersuchungen zum Wirkmechanismus des Carvacrols (Veldhuizen 2006, Ultee 2002 [81,83]) legen die Vermutung nahe, dass die Eigenschaft von Carvacrol und Thymol in wässriger Lösung sowohl als hydrophile als auch als hydrophobe Moleküle aufzutreten eine wichtige Voraussetzung für die gute antimikrobielle Aktivität darstellt. Aliphatische Monoterpene, deren Löslichkeit in der Regel so gering ist, dass sie experimentell kaum nachweisbar ist, haben keine oder nur eine unbedeutende antimikrobielle Aktivität.

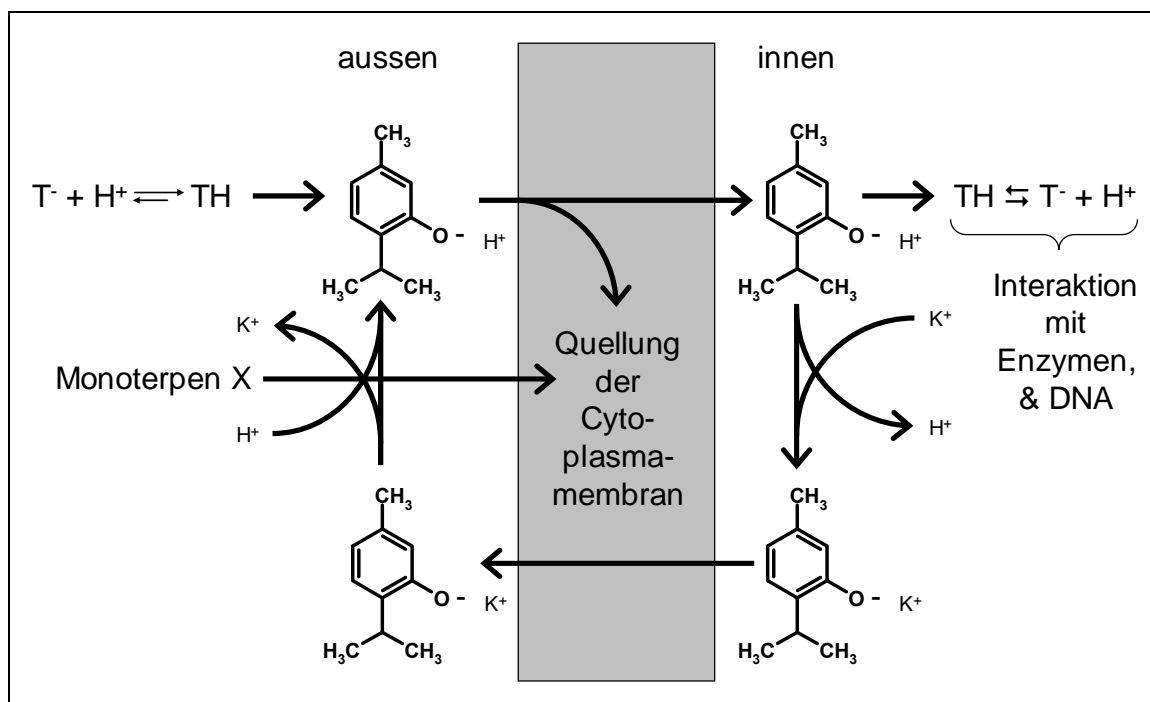
## 9.5 Spekulationen zum Wirkmechanismus

Ultee et al (1999, 2002) [83-84] und Veldhuizen (2006) [81] haben sich eingehend mit den Wirkmechanismen des Carvacrols beschäftigt. An *Bacillus cereus* konnten sie zeigen, dass Carvacrol die Permeabilität der Cytoplasmamembran für  $K^+$  und  $H^+$  erhöht (Ultee 1999) [84]. p-Cymen, das sich nur durch das Fehlen der OH-Gruppe von Carvacrol unterscheidet, akkumuliert zwar ebenfalls in der Cytoplasmamembran, es kommt jedoch trotz Quellung der Membran zu keinem vermehrten Ionenaustausch. Die antimikrobielle Aktivität von Menthol, das sich von Thymol nur durch das Fehlen des Ringsystems delokalisierter Elektronen unterscheidet, ist wesentlich geringer als die von Thymol und Carvacrol. Ultee et al. (2002) [83] postulieren deshalb, dass Carvacrol und Thymol als Membrantransporter für monovalente Kationen agieren, wodurch eine Efflux an  $K^+$ -Ionen und ein Influx von  $H^+$ -Ionen zustande kommt, der letztlich zu einem Verlust des Protonengradienten über der Membran und damit zum Untergang der Zellen führt. Auch Lambert et al. 2001 [85] konnten bei *Staph. aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* in Gegenwart einer Mischung aus Carvacrol und Thymol bereits unterhalb der MHK Verluste von  $K^+$  und  $PO_4^{3-}$  beobachten. Helander et al. (1998) konnten bei *E. coli* in Gegenwart von Carvacrol und Thymol erniedrigte intrazelluläre und erhöhte extrazelluläre ATP-Konzentrationen nachweisen [86]. In vergleichenden Untersuchungen konnten Veldhuizen et al. (2006) [81] mit 2-Amino-p-Cymen zeigen, dass die Hydroxygruppe zwar nicht essentiell ist, jedoch zur Stärke der antimikrobiellen Aktivität beiträgt. Die beiden Verbindungen sind in etwa gleich gut löslich und unterscheiden sich nur in der Hydroxy- bzw. Amino-Gruppe. Carvacrol wirkt aber etwa 3-mal stärker als 2-Amino-p-Cymen. Sie schliessen daraus unter anderem, dass der Ionen-Shuttle des Carvacrols zwar eine gewisse Rolle spielen könnte, dass aber in erster Linie die Einlagerung in die Membran und die Zerstörung ihrer Integrität die hauptsächlichen Wirkmechanismen darstellen. Begleitstoffe wie p-Cymen oder 1,8-Cineol, die selbst keine oder nur eine geringe antimikrobielle Aktivität besitzen, können als penetration enhancer die Wirksamkeit anderer Moleküle steigern [6,87]. Die Kombination Carvacrol und p-Cymen beispielsweise entfaltet in Gegenwart von Candida-Arten synergistische Wirkung [6]. Es wäre deshalb denkbar, dass ein Teil des partiell synergistischen Effektes der Carvacrol-Linalool- und der Thymol-Linalool-Kombinationen in Gegenwart von *Klebsiella pneumoniae* ebenfalls darauf beruht, dass Linalool unter anderem als penetration enhancer das Eindringvermögen von Carvacrol und Thymol in die Cytoplasmamembran unterstützt. Das Penetrationsvermögen der Monoterpene spielt auch bei Mundwässern eine wichtige Rolle. Ouhayoun [88] konnte zeigen, dass die Monoterpene den Plaque-Biofilm durchdringen und innert kürzester Zeit die Mikroorganismen abtöten. Das Penetrationsvermögen der Monoterpene ist die entscheidende Voraussetzung für diese schnelle Wirkung.

Lange Zeit ging man davon aus, dass die Toxizität und damit auch die antibakterielle Wirkung von Phenolen ausschliesslich auf der undissoziierten lipophilen Form beruhe. Neueren Vorstellungen zufolge ist die pH-Wert abhängige Toxizität ionogener Substanzen, wie sie Phenole darstellen, nicht ausschließlich auf die Aktivität der undissoziierten Phenol-Form allein zurückzuführen, sondern zusätzlich auf den Beitrag der ionisierten Spezies [89-90]. Bei der zitierten Literatur handelt es sich um ökotoxikologische Arbeiten, die die toxische Wirkung von Phenolen an Fischen (oder anderen aquatischen Lebensformen) untersuchten. Da sich die (osmotisch aktive) Cytoplasmamembran der Bakterien, mit Ausnahme der Hopanoide, die an Stelle des Cholesterins zur Stabilisierung in die Membran eingelagert werden, praktisch nicht von der Cytoplasmamembran der Eukaryoten unterscheidet [57], lassen sich diese Ergebnisse durchaus auf Mikroorganismen übertragen, wenn auch Interaktionen mit der Zellwand und den zum Teil vorhandenen Schleimhüllen ebenfalls zu berücksichtigen sind.

Es gilt zu beachten, dass sich die stärkere antimikrobielle Wirkung des Carvacrolöls im Vergleich zu den artifiziellen Kombinationen (CT & CTL) nicht auf den im Checkerboard-Assay gefundenen partiellen Synergismus zwischen CL und TL zurückführen lässt, denn im Carvacrolöl liegen ganz andere Kombinationsverhältnisse vor, wie die Gc-Analyse zeigt. Offensichtlich tragen Inhaltsstoffe, die für sich keine oder nur eine unbedeutende antimikrobielle Aktivität haben, ebenfalls zur Gesamtwirkung des Vielstoffgemisches Carvacrolöl bei. Möglicherweise verbessern auch sie die Löslichkeit oder fördern als penetration-enhancer (Monoterpen X in Abb. 64) das Ein- bzw. Durchdringen durch die Cytoplasmamembran [91].

Die antimikrobielle Wirkung ist nicht nur von den Eigenschaften der Monoterpene (Löslichkeit, Funktionelle Gruppen, etc.) abhängig, sondern ebenso sehr von den Eigenschaften der Mikroorganismen und dem sie umgebenden Milieu. Obwohl sie sich äusserlich kaum unterscheiden, weisen Mikroorganismen eine grosse Vielfalt im Stoffwechselgeschehen auf. Auch die Zusammensetzung der Lipide und die Ladung der Cytoplasmamembran sind von Bedeutung [92]. Sind die Monoterpene erst mal in die Zelle eingedrungen, können sie mit intrazellulären Objekten, insbesondere mit Enzymen [93-94] und der DNA [95-96] interagieren. Die Wirkung niedrig dosierter ätherischer Öle beruht wahrscheinlich eher auf Interaktionen mit cytoplasmatischen Elementen als auf Interaktionen mit der Cytoplasmamembran. Interaktionen mit cytoplasmatischen Faktoren verlaufen jedoch langsamer, da sie sich erst durch den veränderten Stoffwechsel manifestieren. Hierzu gehören die klinischen Wirkungen, beispielsweise die relaxierende Wirkung auf die Bronchien [97-98], Wundheilungsfördernde Effekte [38], antiinflammatorische Effekte [99] oder neuroprotektive Effekte [45].



**Abb. 64:** Graphische Zusammenfassung der möglichen Wirkmechanismen von Thymol und Carvacrol (abgeändert nach Ultee et al. 2002).

## 9.6 MHK- & MBK-Werte

### 9.6.1 MHK-Werte und LD<sub>50</sub>-Werte

Die MHK-Werte des Carvacrolöls waren um das 30 bis 12'500 Fache höher, als die MHK-Werte der beiden Antibiotika Ampicillin und Gentamycin, obwohl Carvacrolöl zu den am stärksten antibakteriell wirkenden ätherischen Ölen zählt (Tab. 17). Der höchste MHK-Wert des Carvacrolöls (*Staph. epidermidis* = ca. 400 µg/ml  $\cong 4 \cdot 10^{-4}$  g/g Suspension) lag jedoch noch knapp unterhalb der toxischen Konzentration (orale akute LD<sub>50</sub> = 980mg/kg KG bei der Ratte  $\cong 9.8 \cdot 10^{-4}$  g/g KG; dermal 2g/kg KG bei der Ratte: [100]). Von der Einnahme ätherischer Öle wird in der Regel abgeraten. Insbesondere phenolhaltige ätherische Öle wie das Thymianöl sind in höheren Dosen neurotoxisch. In den wenigen Fällen, in denen die Einnahme ätherischen Öls dennoch angebracht ist, sollte nicht mehr als 3-5 Tropfen auf einem Stück Zucker, einem Stück Brot oder mit einem Glas Wasser eingenommen werden. Ein Tropfen ätherisches Öl entspricht etwa 1/20 ml und 1ml ätherisches Öl wiegt ziemlich genau 1g. Die Konzentration des eingenommenen Öls beträgt bei einer Person von 70 kg Körpergewicht  $3.6 \cdot 10^{-3}$  g/kg KG und liegt damit um das Tausendfache unter dem LD<sub>50</sub>-Wert für Ratten (Es existieren keine LD<sub>50</sub>-Werte für den Menschen). Ätherische Öle werden als lipophile Substanzen gut über die Haut aufgenommen, worauf bereits der geringe Unterschied zwischen oralem und dermalem LD<sub>50</sub>-Wert bei den Ratten hinweist. Ätherische Öle gelangen schnell ins Blut und über das Blut praktisch in alle Organe. Aufgrund ihrer hydro- und

lipophilen Eigenschaften hätten sie das Potential systemische Wirkungen zu entfalten. Die Halbwertszeit ätherischer Öle ist jedoch relativ kurz ( $t_{1/2} \approx 10$  Std.). Ein kleiner Teil des Carvacrols und Thymols sowie deren Metaboliten werden über die Lunge ausgeschieden [101] und reichern sich dort vorübergehend wahrscheinlich etwas an, wodurch eine gewisse systemische Wirkung zustande kommt. Hochempfindliche Keime wie *Moraxella catarrhalis* könnten möglicherweise auf Grund dieser Akkumulation in ihrem Wachstum durch Carvacrolöl und/oder seine Metaboliten bereits gehemmt werden. Auch die gute Wirkung oraler Gaben bei Bronchitis, wie sie für Bronchicum nachgewiesen wurden [47-48], beruhen zum Teil auf der systemischen Wirkung der ätherischen Öle.

### 9.6.2 MHK des Carvacrolöls und der Monosubstanzen

Fasst man die MHK-Mittelwerte des ätherischen Öls (Cve) und seiner beiden aktivsten Monosubstanzen (Cvm, Thm) für die sechs untersuchten Keime als Medianwerte zusammen, und vergleicht sie, so zeigt die statistische Auswertung (mittels Friedman- und Wilcoxon-Wilcox-Test;  $\alpha = 5\%$ ), dass das Carvacrolöl der Monosubstanz Thymol signifikant überlegen ist. Zwischen den beiden Monosubstanzen Carvacrol und Thymol, sowie zwischen dem Carvacrolöl und der Monosubstanz Carvacrol lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen (Abb. 34). Diese Resultate werden durch die Time-Kill-Resultate zum Teil bestätigt, denn das Carvacrolöl hatte eine deutlich höhere Absterberate als die artifiziellen Kombinationen CT und CTL. Der Unterschied betrug bei Konzentrationen oberhalb einer MHK nach 24 Stunden mehr als das 100-fache, womit eine synergistische Überlegenheit von Cve gegenüber CT und CTL vorliegt. Die Bestätigung, dass das Thymianöl als Vielstoffgemisch den aktiven Monosubstanzen und den artifiziellen Kombinationen überlegen ist, ist zwar deutlich aber im Ausmass eher bescheiden.

### 9.6.3 Das Wirtsspektrum

Ätherische Öle sind bekannt für ihr breites Wirtsspektrum. Das Wirtsspektrum des Thymianöls erstreckt sich nicht nur auf eine breit gefächerte Palette von Bakterien sondern auch auf Pilze [32,93,102], Viren [36], sowie Varroa Milben [103] und Rundwürmer. Darüber hinaus wirkt es als Repellens gegen gewisse Insekten (z.B. Stechmücken). Die stärkste antimikrobielle Aktivität zeigen in der Regel die phenolischen Verbindungen. Bei Pilzen scheinen dagegen Alkohole und Ether oft stärker zu wirken als die Phenole [104-105]. Carvacrol wirkt in 2-3-facher MHK sogar gegen Sporen des Nahrungsmittelpathogens *Bacillus cereus* [106]. Die beiden untersuchten Thymianöle zeigten bei allen untersuchten grampositiven und gramnegativen Bakterien und beim Hefepilz *Candida albicans* eine vergleichbar gute antimikrobielle Wirkung. Das

Wirtsspektrum der Monosubstanzen unterschied sich nicht von den beiden Vielstoffgemischen Carvacrolöl und Linaloolöl. Es wäre jedoch denkbar, dass das Wirtsspektrum der Vielstoffgemische breiter ist als das der aktiven Monosubstanzen. Insbesondere dürften auch Kombinationen verschiedener ätherischer Öle ein breiteres Wirtsspektrum aufweisen, selbst wenn keine synergistischen Effekte auftreten [107].

#### **9.6.4 Die Empfindlichkeit der Mikroorganismen**

Die Konzentrationen (MHK) die erforderliche waren, um den empfindlichsten und den widerstandsfähigsten Keim zu hemmen, unterschieden sich bei den Antibiotika viel stärker als bei den ätherischen Ölen. Um den widerstandsfähigsten Keim zu hemmen, war eine 63-mal bzw. 124-mal höhere Konzentration Gentamycin bzw. Ampicillin erforderlich als für den empfindlichsten Keim. Bei den ätherischen Ölen reichte eine zwei- bis vierfache Erhöhung der Konzentration aus, um auch den widerstandsfähigsten Keim zu hemmen. Diese geringen zwischenartlichen Unterschiede der MHK-Werte gelten allgemein als Hinweis darauf, dass bei ätherischen Ölen unspezifische Wirkmechanismen dominieren. Im gleichen Sinne interpretierbar ist das breite Wirtsspektrum der ätherischen Öle und die geringen Unterschiede zwischen den MHK- und den MBK-Werten.

#### **9.6.5 Die MBK der ätherischen Öle**

Die MHK- und MBK-Werte liegen mit wenigen Ausnahmen bei allen Ölen und Mikroorganismen sehr nahe beieinander. Im Mittel lag der MBK-Wert beim Carvacrolöl, der Monosubstanz Carvacrol und beim Linaloolöl nur um den Faktor 1.4 über dem MHK-Wert. Bei der Monosubstanz Thymol war der MBK-Wert durchschnittlich um den Faktor 1.8 grösser und bei der Monosubstanz Linalool um den Faktor 3.26. Der grösste Unterschied zwischen der MHK und der MBK ( $MBK = 9.45 \times MHK$ ) wurde bei der Monosubstanz Linalool und *E. coli* gefunden. Die Ergebnisse der Time-Kill-Assays bestätigten die MBK-Werte und zeigen, dass bereits eine geringfügige Erhöhung der Ätherischöl Konzentration zu einer starken Beschleunigung der Absterberate führt.



## 9.7 Adaptationsversuche

Dass sich Bakterien an subletale Dosen ätherischen Öls anzupassen vermögen, wurde bereits verschiedentlich gezeigt [108]. Es konnte auch gezeigt werden, dass der Adaptationsmechanismus der Bakterien zumindest teilweise darin besteht, die Fettsäurezusammensetzung der Zellmembran so zu verändern, dass sie den Angriffen der ätherischen Öle besser widerstehen [12]. Dieser Adaptation sind aber relativ enge Grenzen gesetzt. Ausgehend von der subletalen Dosis von ca. 1 MHK wurde in Intervallen von 2 Stunden die MHK um die Konzentration einer MHK erhöht (+ 1 MHK / 2 Std.). Keiner der untersuchten Keime war in der Lage sich an Konzentrationen von 4 MHK oder mehr zu adaptieren. Adaptierte Keime (Wachstum bei 3 MHK), die während 24 Stunden in Medium heranwuchsen, das keine ätherische Öle enthielt, hatten bereits wieder ihre ursprüngliche Empfindlichkeit gegenüber den ätherischen Ölen erlangt. Es scheint sich also tatsächlich um Adaptationen zu handeln und nicht um eine Selektion widerstandsfähiger Keime. Bis heute scheinen keine Resistenz gegenüber ätherischen Ölen aufgetreten zu sein. Verantwortlich dafür ist wahrscheinlich in erster Linie der chemisch-physikalische Wirkmechanismus an der Zellmembran, der vermutlich jenseits der Grenze der genetischen Anpassungsfähigkeit für Mikroorganismen liegt und der bei ausreichend hohen Konzentrationen den Mikroorganismen nicht einmal Zeit für eine Adaptation lässt, wie die TK-Versuche zeigen.

## 10 Zusammenfassung

Phytopharmaka unterscheiden sich von schulmedizinischen Arzneimitteln vor allem durch die Vielzahl der Inhaltsstoffe und der Abwesenheit synthetischer oder halbsynthetischer Verbindungen. Phytopharmaka enthalten mitunter Hunderte von Inhaltsstoffen. Von einigen pflanzlichen Arzneimitteln sind mittlerweile die Wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe bekannt. Besonders die stark wirksamen Alkaloide sind längst identifiziert und gehören als Reinsubstanzen zum Basissortiment der schulmedizinisch verwendeten Inhaltsstoffe. Die Möglichkeit stark wirksame Substanzen mit geringer therapeutischer Breite als Reinstoffe darzustellen, hat die Anwendung dieser Substanzen wesentlich sicherer gemacht und stellt einen enormen Fortschritt in der Entwicklung der Pharmakotherapie dar. Ursprünglich beruht die Verwendung pflanzlicher Arzneimittel auf mehr oder weniger langen Traditionen, also auf der Überlieferung gesammelter Erfahrungen. Heutzutage werden aber auch von pflanzlichen Arzneimitteln wissenschaftliche Belege (RCT-Studien) für die klinische Wirksamkeit gefordert. Schulmedizinische Arzneimittel dagegen sind Kinder der modernen pharmazeutischen Techniken und Verfahren. Die Wirkstoffe sind in der Regel von Anfang an bekannt und ihre Selektion unterliegt strengen wissenschaftlichen Kriterien. Die Empirie wird erst nach und nach in den verschiedenen Stadien der klinischen Tests gesammelt. Trotz allen Bemühungen die Wirkstoffe zu identifizieren und ihren Wirkmechanismus aufzuklären, sind die Wirkstoffe pflanzlicher Arzneimittel häufig unbekannt oder die bekannten Wirkstoffe erklären die beobachteten klinischen Wirkungen oft nur unvollständig. Ein grosser Teil der pharmakologischen Wirkungen dieser Vielstoffgemische beruht auf dem Zusammenspiel mehrerer oder vieler Inhaltsstoffe. Es wird in diesem Zusammenhang oft vom Extrakt als dem eigentlichen Wirkstoff gesprochen. Das heisst, dass aus Mangel an genauer Kenntnis das Vielstoffgemisch als ganzes für die Wirkung verantwortlich gemacht wird. Die Untersuchung komplexer Vielstoffgemische stellt in verschiedener Hinsicht eine grosse Herausforderung dar. An oberster Stelle steht der enorme Aufwand für eine erschöpfende Untersuchung. Nicht zuletzt aus diesem Grund haben wir für unsere Untersuchungen Thymianöl gewählt. Ätherische Öle sind zwar echte Vielstoffgemische, im Vergleich zu Extrakten aber relativ homogen zusammengesetzt. Sie bestehen hauptsächlich aus Monoterpenen und Sesquiterpenen. An drei grampositiven und zwei gramnegativen Bakterienstämmen sowie am Hefepilz *Candida albicans* wurde die antimikrobielle Aktivität des Thymianöls (Chemotyp Carvacrol) untersucht. Dabei wurde das Vielstoffgemisch Carvacrolöl mit den aktiven Monosubstanzen (Carvacrol, Thymol und Linalool), mit Zweierkombinationen der aktiven Monosubstanzen und mit artifiziellen Kombinationen verglichen, wobei Letztere als aktive Fraktionen des Carvacrolöls aufgefasst werden können.

In Vorversuchen wurden Fragen zur Methodik, die sich im Zusammenhang mit der Verwendung ätherischer Öle ergaben, geklärt. Es stellte sich heraus, dass 0.05% Agar als Dispersionsmittel im Müller-Hinton-Medium dem Detergens Tween-80 vorzuziehen ist und dass sich vollständig abdichtende Klebfolien und Parafilm an Stelle der herkömmlichen Deckel als Abdeckung der Mikrotiterplatten nicht eignen. Carvacrolöl liess sich in Konzentrationen unter 1% problemlos im Müller-Hinton-Medium mit 0.05% Agar lösen. Unterschiedliche Mischverfahren und Mischintensitäten wirkten sich beim Einbringen des ätherischen Öls in Müller-Hinton-Broth nicht auf die MHK aus. Carvacrolöl und seine aktiven Komponenten zeigten auch nach 24 Stunden in Müller-Hinton-Medium noch die volle antimikrobielle Aktivität.

Die am häufigsten verwendeten Methoden zur Erfassung von Kombinationswirkungen, die Checkerboard-Methode (ChM) und die Time-Kill-Methode (TKM), werden im Bereich der Phytopharmakaforschung, im Gegensatz zur Antibiotikaforschung, nur punktuell und sehr fragmentarisch eingesetzt. Die Auswertungen und Interpretationen der Ergebnisse sind von Willkür geprägt anstatt von Standards im Sinne einer "good laboratory practice". Deshalb wird in der vorliegenden Arbeit ein systematisches Vorgehen für die Verwendung der beiden Methoden sowie für die Auswertung der Daten vorgestellt, das den Stärken und Schwächen der beiden Methoden Rechnung trägt: Als erstes wurden Kriterien für die Auswahl der relevanten Messpunkte der ChM ausgearbeitet. In Isobologrammen werden die relevanten Messpunkte graphisch dargestellt und bei Vorliegen eines sichtbaren Trends Konfidenzintervalle der gepoolten FICI-Werte berechnet. Die Bereiche rein additiv (CI enthält 1), überadditiv ( $0.5 < CI < 1$ ), partiell synergistisch (CI enthält 0.5) und synergistisch ( $CI < 0.5$ ) wurden eingeführt. Eine Unterteilung ohne klinische Relevanz aber hilfreich für die vorliegenden Fragestellungen zur in-vitro Aktivität.

Mit Hilfe der ChM konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart von *Klebsiella pneumoniae* die Mischungen Carvacrol-Linalool (Linalool  $\geq 20\%$ ) und Thymol-Linalool (Linalool  $\geq 66\%$ ) partiell synergistisch wirken. Im nativen Carvacrolöl liegen jedoch ganz andere Mischungsverhältnisse vor (Linalool  $\approx 3\%$ ), infolgedessen tritt dieser partielle Synergismus im nativen Carvacrolöl nicht auf.

Die TKM liefert ein dynamisches Bild der antimikrobiellen Aktivität. Mit ihr wurde die eigentliche Stärke der ätherischen Öle aufgedeckt. Es ist dies die rasante Zunahme der Absterberate, sobald die Konzentration des Carvacrolöls die MBK überschreitet. Konzentrationen von über 2-3-MHK bewirken ein vollständiges Absterben der Keime innerhalb von 15 Minuten. Im Konzentrationsfenster zwischen 1 - 3 MHK wird in vergleichenden Untersuchungen zwischen dem Vielstoffgemisch Carvacrolöl und den artifiziellen Kombinationen eine synergistische Aktivität des Carvacrolöls sichtbar, die auf Interaktionen zwischen den Hauptwirkstoffen und

Begleitstoffen beruht, die keine oder nur eine geringe antimikrobielle Aktivität aufweisen.

Ein Vergleich der ChM- und der TKM zeigt, dass sich die beiden Methoden hinsichtlich Definition, Messung und Berechnung für Synergismus deutlich voneinander unterscheiden. Bei der TKM werden in bestimmten Zeitintervallen mittels Verdünnungsreihen Unterschiede in der Keimdichte bestimmt. Dies liefert wesentlich genauere Resultate als die visuelle Beurteilung der Trübung von Zellen der Mikrotiterplatte, wie dies bei der ChM zur Bestimmung der MHK üblich ist. Eine Keimdichte  $\leq 10^6$  cfu/ml lässt sich in der Regel visuell nicht mehr erkennen und somit sind auch Unterschiede der Keimdichte unterhalb von  $10^6$  cfu/ml nicht mehr erfassbar. Schon aus diesem Grund vermag die TKM noch synergistische Effekte aufzudecken, wo eine visuelle Differenzierung der Trübung mit der ChM längst nicht mehr möglich ist. Die beiden Methoden erfassen offensichtlich unterschiedliche Aspekte der antimikrobiellen und synergistischen Aktivität. So konnten mit der ChM potentielle und mit der TKM aktuelle synergistische Wechselwirkungen des Vielstoffgemisches Carvacrolöl aufgedeckt werden. Die beiden Methoden sollten weniger gegeneinander ausgespielt werden, sondern vielmehr als sich ergänzende Methoden verstanden werden, die unterschiedliche Aspekte erfassen.

Die schnelle Absterberate des Carvacrolöls gilt es besonders hervorzuheben. Sie liefert eine rationale Begründung für die äusserlichen Anwendungen des Carvacrolöls. Der extrem schnelle Eintritt der bakteriziden Wirkung ab Konzentrationen  $> \text{MBK}$  ist dann von klinischer Bedeutung, wenn wenig Zeit für die Interaktion zwischen Pathogen und ätherischem Öl bleibt, wie beim Gurgeln, Inhalieren, bei Bädern und der lokalen Wundversorgung. In all diesen Fällen ist die schnelle und gründliche Eradikation eine Voraussetzung für die klinische Wirksamkeit der ätherischen Öle. Die synergistische Überlegenheit des Vielstoffgemisches Carvacrolöl gegenüber den artifiziellen Kombinationen und den aktiven Monosubstanzen manifestiert sich hauptsächlich in einer schnelleren Eradikation. Obwohl diese Überlegenheit in der vorliegenden Arbeit nur in Gegenwart von *K. pneumoniae* beobachtet werden konnte, ist nicht auszuschliessen dass Carvacrolöl als Vielstoffgemisch auch in Gegenwart anderer Keime, den aktiven Monosubstanzen überlegen ist.

**Ausblick:** Die Ergebnisse haben gezeigt, dass das Carvacrolöl sowohl aktuelle als auch potentielle synergistische Eigenschaften besitzt. Es wäre deshalb denkbar, dass sich artifizielle Kombinationen finden lassen, deren antimikrobielle Aktivität diejenige des nativen Carvacrolöls übertreffen. Noch viel versprechender sind Untersuchungen der Thymianextrakte. Wässrige Auszüge von *Thymus vulgaris* zeigen eine überraschend gute antimikrobielle Aktivität. Thymianextrakte sind in ihrer Zusammensetzung wesentlich komplexer als ätherische Öle, deshalb ist ihr Potential für synergistische Interaktionen um einiges grösser als das der ätherischen Öle.

## 11 Summary

Herbal remedies are multicomponent mixtures, composed of a large variety of different naturally occurring compounds, often several hundreds in number. They do not contain any synthetic or semisynthetic ingredients, like conventional remedies typically do. Until now, only few of the active compounds have been identified. The strongest of them, the alkaloids, are well known by now. As purified monosubstances they are even an important part of the conventional medicine. The technical feasibility to isolate and purify these substances allowed for a precise dosing of these strong agents thereby improving the safety of their application. This was an important development in pharmacotherapy.

Nowadays, conventional drugs begin their life in-silico, where known compounds are modified exhaustively or artificial compounds are designed. A huge number of synthesized compounds is screened by biochemical analysis for potential activity and/or interactions with biomolecules. After further in-vitro and in-vivo analysis they enter the clinical level. In contrast, the application of herbal remedies was based on tradition, on transmitted empirical knowledge. After being used for centuries, these remedies are now studied in randomized clinical trials (RCT) to prove their clinical efficacy, their compounds are isolated and identified and their possible modes of action are analyzed on a biochemical and molecular level.

Despite enormous efforts to discover the active compounds and to understand their mechanism of action many remain unknown or the discovered compounds do not explain all the observed clinical efficacies. Therefore the extract as a whole is said to be the active compound. One of the biggest challenges to analyze possible interactions of a multi-compound mixture is the enormous expense. Therefore, we decided to examine the essential oil of thyme. Essential oils are real multicomponent mixtures but they are relatively homogenous compared to extracts. They are composed ordinarily of monoterpenes, sesquiterpenes and phenylpropanes. The carvacrol oil, seven monosubstances of the carvacrol oil and artificial combinations of the monosubstances were tested against three grampositive and two gramnegative bacteria and against the yeast *Candida albicans*.

Several questions concerning the methodology of using essential oils had to be clarified in advance. Müller-Hinton-broth containing 0.05% Agar (MH-A) as a means of dispersion yielded better results than the emulsifier Tween-80. Carvacrol oil in a concentration up to 1% was easily soluble in MH-A. Different procedures and intensities to homogenize the essential oil in MH-A had no further effect on the MIC. After 24 hours in MH-A the carvacrol oil and its active components still had their full antimicrobial activity.

The checkerboard-method yields relevant and irrelevant data. Criteria to discriminate between relevant and irrelevant data were worked out in detail. A procedure is proposed that allows for a statistical evaluation of the checkerboard data. Isobolograms were drawn and if trends were discovered, trendlines were drawn and the FICI calculated. The FICI-values were pooled and 95%-confidenceintervals (CI) were calculated. The CI's served to decide whether synergism occurred. Only for *Klebsiella pneumoniae* partial synergism was discovered by using mixtures of monosubstances of Carvacrol and Linalool (Linalool  $\geq 20\%$ ) and of Thymol and Linalool (Linalool  $\geq 66\%$ ). However, the ratio of these mixtures was completely different from the ratio in the native carvacroloil (Linalool  $\approx 3\%$ ). Therefore, this partial synergism wouldn't be found in the carvacroloil.

The time-kill-method revealed a dynamic picture of the antimicrobial activity. The proper strength of the carvacroloil was discovered with this method. It is the rapid acceleration of the kill-rate, as soon as the concentration of the carvacroloil exceeds the MBC. *K. pneumoniae*, *St. epidermidis*, *Escherichia coli* and *C. albicans* were completely eradicated within 15 minutes in the presence of 2-3 MIC carvacroloil. Comparisons between the carvacroloil and artificial combinations of the active compounds (carvacrol, thymol and linalool) in identical proportions as in the carvacroloil revealed synergistic activity of the carvacroloil. This antimicrobial activity is the result of synergistic interactions between active compounds and compounds without any antimicrobial activity of their own. This emphasizes the usefulness of multicomponent mixtures.

The comparison between the checkerboard- and the time-kill-method showed that the two methods differ concerning the definition, measurement and the calculation for synergism. Therefore they record different aspects of antimicrobial and synergistic activity.

The checkerboard-method only reveals MICs that prevent visible growth. However bacterial suspensions  $\leq 10^6$  cfu/ml show no turbidity, so bacterial load as big as  $0 - 10^6$  cfu/ml remain completely undetected. In contrast the time-kill-method measures absolute numbers of colony-forming units over time. Synergism that occurs in a density range below  $10^6$  cfu/ml will be detected by the time-kill-method but not by the checkerboard-method. This is one of the most important reasons for the differences between the two methods.

The rapid kill-rate at concentrations  $\geq$  MBC is a very important property of the carvacroloil and particularly advantageous for the topical application of the oil. The immediate onset of the bactericidal effect is of clinical relevance since the time of contact between the essential oil and the infected tissues is relatively short, which is the case for most of the topical applications such as gargeling, wound-management, other topical infections and even for inhalation. The promptness of the antibacterial activity might also prevent the development and selection of resistant germs.

**Perspective:** Even more interesting than the relatively homogenous essential oils concerning synergistic interaction might be the aqueous extracts of *thymus vulgaris*. The aqueous extract of *thymus vulgaris* develops considerable antibacterial activity. Since the composition of these extracts is even more complex than those of the essential oils, the potential for synergistic interactions will increase once more.

## 12 Anhang

### 12.1 "Analysenzertifikat" Farfalla

Produkt Analysezertifikat		
<b>Produktbezeichnung:</b>	<b>Thymian Thymol kbADemeter</b>	
INCI-Bezeichnung:	Thymus vulgaris	
CAS Nr.:	8007-46-3	
EINECS Nr.:	284-535-7	
Herkunft:	Italien	
Herstellung:	Destillation aus Kraut und Blüten	
Chargen Nr.:	025119	
Datum/Erstellt von:	15.02.05/pf	
<b><u>Organoleptik:</u></b>	<b><u>Soll-Wert</u></b>	<b><u>Ist-Wert</u></b>
Konsistenz:	flüssig	entspricht
Farbe:	hellgelb	entspricht
Geruch:	charakteristisch	
entspricht		
<b><u>Physikalische Kennzahlen:</u></b>		
Dichte bei 20° C :	0.916 - 0.931 g/ccm	0.9267
Brechungsindex bei 20°C:	1.495 - 1.5052 n.D	1.5004
Fammpunkt:	55° C	
Hauptinhaltsstoffe:	Gamma Terpinene, Thymol, Benzene	
Lagerung:	kühl und luftdicht verschlossen aufbewahren	
Haltbarkeit:	4 Jahre	
Farfalla Essentials AG	Datum: 15.02.05	



## 12.2 Ergänzungen zu den Berechnungen

### 12.2.1 Abschätzung der Chemotypenanteile im Farfallaöl

$$\begin{array}{c} \text{Öl} \\ \text{Batch 2} \end{array} \quad \begin{array}{c} \text{reine Chemotypen} \\ \text{Th} \quad \text{Cv} \quad \text{Lo} \end{array}$$

$$\begin{pmatrix} 16 \\ 49 \\ 3 \end{pmatrix} = x \cdot \begin{pmatrix} 52 \\ 4 \\ 4 \end{pmatrix} + y \cdot \begin{pmatrix} 3 \\ 57 \\ 1 \end{pmatrix} + z \cdot \begin{pmatrix} 2 \\ 1 \\ 81 \end{pmatrix}$$

⇒ Anschliessend Normierung der Anteile auf:  $x + y + z = 100\%$

### 12.2.2 Mischungsverhältnisse in den ätherischen Ölen

Berechnung der tatsächlichen Konzentrationsverhältnisse der Hauptkomponenten Carvacrol, Thymol und Linalool in Mischungen der Vielstoffgemische Cve und Loe, die additive Effekte zeigten. Die Berechnung entspricht der Bildung eines Chuquet-Mittelwertes.

Mischungsverhältnis der unteren Grenze:

$$\frac{\text{Cve}}{\text{Loe}} = \frac{16}{1} = \frac{\overbrace{16 \cdot (36.06 + 16.7)}^{\text{Cvm} + \text{Thm}} \oplus \overbrace{1 \cdot (0.17 + 3.74)}^{\text{Cvm} + \text{Thm}}}{\underbrace{16 \cdot (4.4)}_{\text{Lom}} \oplus \underbrace{1 \cdot (72.33)}_{\text{Lom}}} = \frac{\text{Cvm} + \text{Thm}}{\text{Lom}} = \frac{6}{1}$$

Mischungsverhältnis der oberen Grenze:

$$\frac{\text{Cve}}{\text{Loe}} = \frac{1}{120} = \frac{\overbrace{1 \cdot (36.06 + 16.7)}^{\text{Cvm} + \text{Thm}} \oplus \overbrace{120 \cdot (0.17 + 3.74)}^{\text{Cvm} + \text{Thm}}}{\underbrace{1 \cdot (4.4)}_{\text{Lom}} \oplus \underbrace{120 \cdot (72.33)}_{\text{Lom}}} = \frac{\text{Cvm} + \text{Thm}}{\text{Lom}} = \frac{1}{16}$$

### 12.2.3 Tabelle mit Messwerten eines Checkerboard-Assay

Mischung	[ug/ml]		[Ck/Ca] + [Lk/La] = FICI			n
Cve/Loe	[Cve]	[Loe]				
1 / 0	156	0	1	0	1	
7.800	78	10	0.5000	0.0080	<b>0.508</b>	1
3.900	78	20	0.5000	0.0160	<b>0.516</b>	2
1.950	78	40	0.5000	0.0320	<b>0.532</b>	3
0.975	78	80	0.5000	0.0640	<b>0.564</b>	4
0.500	78	156	0.5000	0.1248	<b>0.625</b>	5
0.250	78	312	0.5000	0.2496	<b>0.750</b>	6
0.128	40	312	0.2564	0.2496	<b>0.506</b>	7
0.064	20	312	0.1282	0.2496	<b>0.378</b>	8
0.032	20	625	0.1282	0.5000	<b>0.628</b>	9
0.016	10	625	0.0641	0.5000	<b>0.564</b>	10
0 / 1	0	1250	0	1	1	

<b>CI<sub>95</sub>:</b>	<b>0.488 – 0.557 – 0.626</b>
-------------------------	------------------------------

#### Legende:

Ck = Cve in Kombination; Ca = Cve allein (=MHK)

Lk = Loe in Kombination; Ca = Loe allein (=MHK)

#### Faustregel zur Prüfung der FICI-Werte auf Normalverteilung:

<b>0.9 &lt; Median / Mittelwert &lt; 1.1</b>	<b>&amp;</b>	<b>3-Stdv. &lt; Mittelwert</b>
<b>0.9 &lt; 0.984 &lt; 1.1</b>	<b>&amp;</b>	<b>0.294 &lt; 0.557</b>

### 12.2.4 Berechnung der Kombinationsmöglichkeiten von n Inhaltsstoffen

Binomialkoeffizient	Explizite Darstellung	Interpretation	Bsp.: n = 7
$\binom{n}{0}$	1	Nullkontrolle	1
$\binom{n}{1}$	n	Einzelstoffe (Monosubstanzen)	7
$\binom{n}{2}$	$n \cdot (n - 1) / 2$	Kombinationen mit 2 Stoffen	21
$\binom{n}{3}$	$\frac{7!}{(7-3)! \cdot 3!}$	Kombinationen mit 3 Stoffen	35
$\binom{n}{k}$	$\frac{n!}{(n-k)! \cdot k!}$	Kombinationen mit k Stoffen	allg.
$\binom{n}{n-1}$	n	Kombinationen mit n-1 Stoffen	7
$\binom{n}{n}$	1	Kombination mit n Stoffen	1
$\sum_{k=0}^n \binom{n}{k}$	$n^2$	Maximale Anzahl mathematischer Kombinationen	49
$\sum_{k=2}^n \binom{n}{k}$	$n^2 - (n + 1)$	Maximale Anzahl reeller Kombinationen (mit Interaktion)	42

**Tab. 28:** Berechnung der Anzahl Kombinationsmöglichkeiten und deren experimentelle Bedeutung. Nicht berücksichtigt sind hier die unterschiedlichen Mischungsverhältnisse und Verdünnungsschritte, die eine 96-Well-Mikrotiterplatte pro Ansatz (pro Kombination) enthält.

## 12.2.5 Ökonomische Verfahren zum Testen von Kombinationen mit mehr als 2 Stoffen (nach Berenbaum 1978)

$$\sum_{i=1}^n \frac{MHK_i}{n} = 1$$

( $\Sigma = 1 \Rightarrow$  additive Wirkung)

Verfahren bei Isobolen mit Trend in nur einer Richtung (Synergismus oder Antagonismus).

Der Anteil der Stoffe (1 bis n) in der Mischung ist proportional zur jeweiligen MHK.

Beispiel mit 5 Inhaltsstoffen:

$$\frac{MHK_1}{5} + \frac{MHK_2}{5} + \frac{MHK_3}{5} + \frac{MHK_4}{5} + \frac{MHK_5}{5} = 1$$

$$MHK_1 \cdot \left( \frac{n+1}{2n} \right) + \sum_{i=2}^n MHK_i \cdot \left( \frac{1}{2n} \right) = 1$$

( $\Sigma = 1 \Rightarrow$  additive Wirkung)

Verfahren bei Isobolen mit Trend in beiden Richtungen (Synergismus und Antagonismus).

Es sind jeweils n Ansätze erforderlich.

Beispiel mit 5 Inhaltsstoffen:

$$\left( \frac{6 \cdot MHK_1}{10} \right) + \left( \frac{MHK_2}{10} \right) + \left( \frac{MHK_3}{10} \right) + \left( \frac{MHK_4}{10} \right) + \left( \frac{MHK_5}{10} \right)$$

$$\left( \frac{MHK_1}{10} \right) + \left( \frac{6 \cdot MHK_2}{10} \right) + \left( \frac{MHK_3}{10} \right) + \left( \frac{MHK_4}{10} \right) + \left( \frac{MHK_5}{10} \right)$$

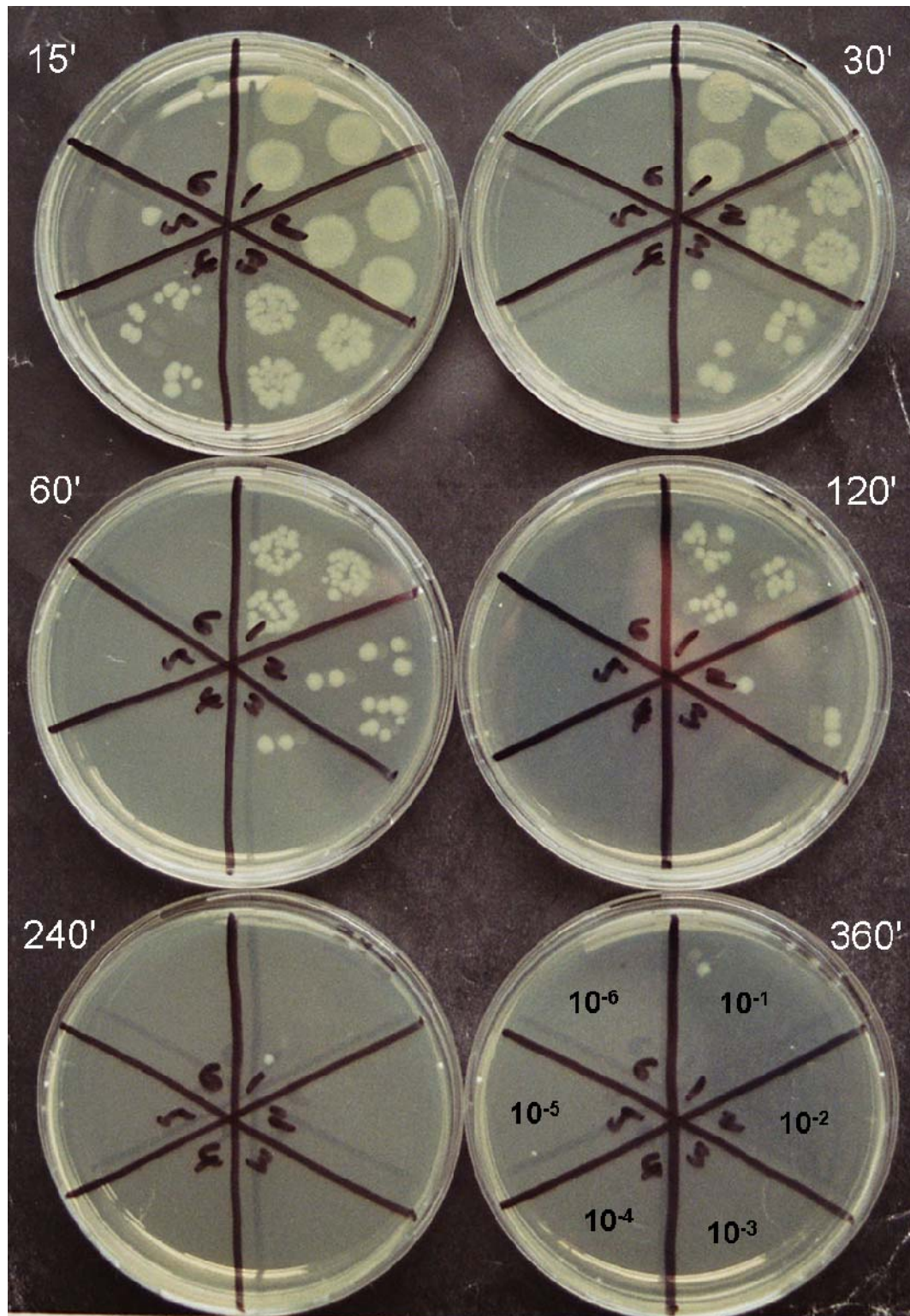
$$\left( \frac{MHK_1}{10} \right) + \left( \frac{MHK_2}{10} \right) + \left( \frac{6 \cdot MHK_3}{10} \right) + \left( \frac{MHK_4}{10} \right) + \left( \frac{MHK_5}{10} \right)$$

$$\left( \frac{MHK_1}{10} \right) + \left( \frac{MHK_2}{10} \right) + \left( \frac{MHK_3}{10} \right) + \left( \frac{6 \cdot MHK_4}{10} \right) + \left( \frac{MHK_5}{10} \right)$$

$$\left( \frac{MHK_1}{10} \right) + \left( \frac{MHK_2}{10} \right) + \left( \frac{MHK_3}{10} \right) + \left( \frac{MHK_4}{10} \right) + \left( \frac{6 \cdot MHK_5}{10} \right)$$

### 12.2.6 Verdünnungsreihen eines Time-Kill-Assay

#### Auswertung einer Time-Kill-Curve *E. coli* & 1-MHK Thymol (Monosubstanz)



**Abb. 65:** Mit 1 cfu/60 $\mu$ l ist bei 240 u. 360 min gerade die Nachweisgrenze erreicht.

## 12.3 Heimische Pflanzen mit Carvacrol bzw. Thymol

### *Origanum vulgare* (Echter Dost, Wilder Majoran)

#### **Vorkommen:**

trockene Wiesen, Säume, lichte Wälder

#### **Inhaltsstoffe:**

Carvacrol (40 – 70%)  
Pinen, Cymen, Myrcen, Thymol, ...  
Labiatergerbstoffe (u.a. Rosmarinsäure)  
Flavonoide (u.a. Naringin)

#### **Verwendungen (als Gewürz und in der Volksheilkunde):**

appetitanregend  
blähungswidrig  
fördert Galleproduktion  
krampflösend  
antiseptisch  
Das Pizza-Gewürz (v.a. *O. vulgare* ssp. *viride*)

### *Satureja hortensis* (Sommer-Bohnenkraut, ☉)

### *Satureja montana* (Winter-Bohnenkraut, )

Wurde wie der Thymian bereits von den antiken Römern kultiviert und verwilderte nördlich der Alpen während der Römerherrschaft und konnte sich an geschützten Stellen zum Teil halten.

#### **Vorkommen:**

Herkunft: östliches Mittelmeer und Schwarzmeerküste

#### **Inhaltsstoffe:**

Carvacrol ( c.a 30%)  
Cymen, Terpinen, Myrcen, Pinen, Thymol, ...  
Labiatergerbstoffe (Rosmarinsäure, Chlorogensäure)  
Flavonoide  
Sterole

#### **Verwendungen (als Gewürz und in der Volksheilkunde):**

blähungswidrige Wirkung (Namensgebend → Bohnenkraut)  
gegen Durchfälle (v.a. Labiatergerbstoffe)  
Halsentzündungen (gurgeln – v.a. Carvacrol))

## 13 Literatur

1. Borisy AA, Elliott PJ, Hurst NW, et al. Systematic discovery of multicomponent therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7977-7982
2. Fitzgerald JB, Schoeberl B, Nielsen UB, Sorger PK. Systems biology and combination therapy in the quest for clinical efficacy. *Nat Chem Biol* 2006;2:458-466
3. Keith CT, Borisy AA, Stockwell BR. Multicomponent therapeutics for networked systems. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:71-78
4. Fraser TR. The antagonism between the actions of active substances. *The British Medical Journal* 1872:485-487
5. Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 2000;406:775-781
6. Pina-Vaz C, Goncalves Rodrigues A, Pinto E, et al. Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004;18:73-78
7. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol* 1998;26:118-122
8. Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food Prot* 2002;65:1545-1560
9. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999;86:985-990
10. Marino M, Bersani C, Comi G. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *J Food Prot* 1999;62:1017-1023
11. Penalver P, Huerta B, Borge C, et al. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. *Apmis* 2005;113:1-6
12. Ultee A, Kets EP, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch Microbiol* 2000;174:233-238
13. Brunschwyg H. Kleines Destillierbuch. Strassburg; 1500

14. Milton G. Nathaniel's Nutmeg, or, The true and incredible adventures of the spice trader who changed the course of the history. New York: Farrer, Strauss and Giroux; 1999
15. Marzell H. Geschichte der Volkskunde der deutschen Heilpflanzen. Stuttgart: Hippokrates-Verlag; 1938
16. Bock H. Kreüterbuch, darin underscheidt Namen und Würckung der Kreütter, Stauden, Hecken und Beumen, sampt ihren Früchten ... Strassburg: Josiam Rihel; 1577
17. Acar JF. Antibiotic synergy and antagonism. Med Clin North Am 2000;84:1391-1406
18. Loewe S. Die Mischarznei. Klinische Wochenschrift 1927;6:10771085
19. Olkkola KT. Klinisch relevante Arzneimittelinteraktionen in der Anästhesie und Intensivmedizin. intense times 2007
20. Bovill JG. Analysis of drug interactions. Baillière's Clinical Anaesthesiology 1998;12:153-168
21. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. J Antimicrob Chemother 2003;52:1
22. Kindorf J. Stoffliche Kombinationswirkungen und ihre Bedeutung für die Umweltpolitik. Marburg: Metropolis-Verlag; 1995
23. Loewe S, Muischnek H. Über Kombinationswirkungen. Naunyn-Schmidberger's Arch exp Pathol Pharmacol 1926;114:313-326
24. Berenbaum MC. A method for testing for synergy with any number of agents. J Infect Dis 1978;137:122-130
25. Pabst G, Köhler FE. Köhler's Medizinal-Pflanzen. Hannover: Verlag Schäfer; 1990
26. Stahl-Biskup Eea. Thyme: the genus Thymus. London: Taylor & Francis; 2002
27. Hegnauer R. Die systematische Bedeutung der ätherischen Öle (Chemotaxonomie der ätherischen Öle). Dragoco Rep 1978:204-230
28. Price S, Price L. Aromatherapie: Praxishandbuch für Pflege- und Gesundheitsberufe. Bern: Verlag Hans Huber; 2003
29. Gildenmeister E, Hoffmann F. Die ätherischen Öle. Berlin: Akademie-Verlag; 1956
30. Tabak M, Armon R, Potasman I, Neeman I. In vitro inhibition of Helicobacter pylori by extracts of thyme. J Appl Bacteriol 1996;80:667-672
31. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. Int J Food Microbiol 2004;94:223-253



32. Nguefack J, Leth V, Amvam Zollo PH, Mathur SB. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *Int J Food Microbiol* 2004;94:329-334
33. Rota C, Carraminana JJ, Burillo J, Herrera A. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *J Food Prot* 2004;67:1252-1256
34. Özkan G, Sagdic O, Özcan M. Inhibition of Pathogenic Bacteria by Essential Oils at Different Concentrations. *Food Sci Tech Int* 2003;9:0085-0084
35. Manou I, Bouillard L, Devleeschouwer MJ, Barel AO. Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *J Appl Microbiol* 1998;84:368-376
36. Koch C, Reichling J, Schnee J, Schnitzler P. Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. *Phytomedicine* 2008;15:71-78
37. Sokovic M, Glamoclija J, Ciric A, et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. and thymol on experimentally induced dermatomycoses. *Drug Dev Ind Pharm* 2008;34:1388-1393
38. Dursun N, Liman N, Ozyazgan I, Gunes I, Saraymen R. Role of thymus oil in burn wound healing. *J Burn Care Rehabil* 2003;24:395-399
39. Lee KG, Shibamoto T. Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *J Agric Food Chem* 2002;50:4947-4952
40. Aeschbach R, Loliger J, Scott BC, et al. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol* 1994;32:31-36
41. Haraguchi H, Saito T, Ishikawa H, et al. Antiperoxidative components in *Thymus vulgaris*. *Planta Med* 1996;62:217-221
42. Youdim KA, Deans SG. Dietary supplementation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil during the lifetime of the rat: its effects on the antioxidant status in liver, kidney and heart tissues. *Mech Ageing Dev* 1999;109:163-175
43. Yamamoto J, Yamada K, Naemura A, Yamashita T, Arai R. Testing various herbs for antithrombotic effect. *Nutrition* 2005;21:580-587
44. Okazaki K, Kawazoe K, Takaishi Y. Human platelet aggregation inhibitors from thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Phytother Res* 2002;16:398-399

45. Jukic M, Politeo O, Maksimovic M, Milos M. In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytother Res* 2007;21:259-261
46. Reiter M, Brandt W. Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea pig. *Arzneimittelforschung* 1985;35:408-414
47. Kemmerich B, Eberhardt R, Stammer H. Efficacy and tolerability of a fluid extract combination of thyme herb and ivy leaves and matched placebo in adults suffering from acute bronchitis with productive cough. A prospective, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Arzneimittelforschung* 2006;56:652-660
48. Gruenwald J, Graubaum HJ, Busch R. Evaluation of the non-inferiority of a fixed combination of thyme fluid- and primrose root extract in comparison to a fixed combination of thyme fluid extract and primrose root tincture in patients with acute bronchitis. A single-blind, randomized, bi-centric clinical trial. *Arzneimittelforschung* 2006;56:574-581
49. Choi WS, Park BS, Ku SK, Lee SE. Repellent activities of essential oils and monoterpenes against *Culex pipiens pallens*. *J Am Mosq Control Assoc* 2002;18:348-351
50. Park BS, Choi WS, Kim JH, Kim KH, Lee SE. Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. *J Am Mosq Control Assoc* 2005;21:80-83
51. Heyland K-U. Ölfrüchte, Faserpflanzen, Arzneipflanzen und Sonderkulturen. Stuttgart: Ulmer; 2006
52. Thompson JD, Chalchat JC, Michet A, Linhart YB, Ehlers B. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *J Chem Ecol* 2003;29:859-880
53. Schneider G, Hiller K. *Arzneidrogen*. 4. ed. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag; 1999
54. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. *Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2001
55. Miksits K, Hahn H. *Basiswissen Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 1999
56. Kulke C. *Bakteriologie*. Nürnberg: Wachholz Verlag; 1994
57. Madigan MT, Martinko JM, Parker J, Brock TD, Goebel W. *Mikrobiologie*. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verlag; 2003

58. Elion GB, Singer S, Hitchings GH. Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. *J Biol Chem* 1954;208:477-488
59. Berenbaum MC. What is synergy? *Pharmacol Rev* 1989;41:93-141
60. Lorian V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5. ed ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2005
61. Fraser. Report on the Physiological Action of Medicinal and Poisonous Substances. *J Anat Physiol* 1872;7:191-200
62. Sachs L, Hedderich J. *Angewandte Statistik*. 12. ed. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2006
63. Gardner MJ, Altman DG. Confidence intervals rather than P values: estimation rather than hypothesis testing. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986;292:746-750
64. Burt SA, Vlieland R, Haagsman HP, Veldhuizen EJ. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. *J Food Prot* 2005;68:919-926
65. Lahlou M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother Res* 2004;18:435-448
66. Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 2003;36:162-167
67. Remmal A, Bouchikhi T, Tantaoui-Elaraki A, Ettayebi M. Inhibition of antibacterial activity of essential oils by tween 80 and ethanol in liquid medium. *J Pharm Belg* 1993;48:352-356
68. van Vuuren SF, Suliman S, Viljoen AM. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett Appl Microbiol* 2009;48:440-446
69. Al-Bayati FA. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *J Ethnopharmacol* 2008;116:403-406
70. Lis-Balchin MD, S. G. Studies on the Potential Usage of Mixtures of Plant Essential Oils as Synergistic Antibacterial Agents in Foods. *Phytotherapy Research* 1998;12:472-475
71. Hall MJ, Middleton RF, Westmacott D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. *J Antimicrob Chemother* 1983;11:427-433
72. May J, Chan CH, King A, Williams L, French GL. Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:639-643

73. Norden CW, Wentzel H, Keleti E. Comparison of techniques for measurement of in vitro antibiotic synergism. *J Infect Dis* 1979;140:629-633
74. Moellering RC, Jr. Antimicrobial synergism--an elusive concept. *J Infect Dis* 1979;140:639-641
75. Greenwood D. Correlation between Methods for the Measurement of Antibiotic Synergy. *J Infect Dis* 1981:757
76. Berenbaum MC. Correlations between methods for measurement of synergy. *J Infect Dis* 1980;142:476-480
77. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1914-1918
78. Sitzmann F. Die mikrobielle Abwehr der Pflanzen nutzen. *Der Merkurstab* 2006;1:24-30
79. Karzel K, Liedke RK. Einführung in die Arzneimitteltherapie. Stuttgart: Gustav Fischer; 1985
80. Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, et al. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J Agric Food Chem* 2007;55:6300-6308
81. Veldhuizen EJ, Tjeerdsma-van Bokhoven JL, Zweijtzer C, Burt SA, Haagsman HP. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *J Agric Food Chem* 2006;54:1874-1879
82. Kishino TK, K. Relation between toxicity and accumulation of chlorphenols at various pH, and their absorption mechanism in fish. *Wat Res* 1995;29:431-442
83. Ultee A, Bennik MH, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:1561-1568
84. Ultee A, Kets EP, Smid EJ. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:4606-4610
85. Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* 2001;91:453-462
86. Helander IM, Alakomi H-L, Latva-Kala K, et al. Characterisation of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *J Agric Food Chem* 1998;46:3590-3595

87. Williams AC, Barry BW. Essential oils as novel human skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics* 1989;57:R7-R9
88. Ouhayoun JP. Penetrating the plaque biofilm: impact of essential oil mouthwash. *J Clin Periodontol* 2003;30 Suppl 5:10-12
89. Walter H-A. Kombinationswirkungen von Umweltchemikalien - Zur Analyse der milieuhabhängigen Mischungstoxizität von Kontaminanten mit unbekanntem Wirkungsmechanismus in umweltrelevanten Konzentrationen. In, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; 2002
90. Schüürmann G, Markert B. *Ecotoxicology - Ecological Fundamentals, Chemical Exposure, and Biological Effects*. New York: John Wiley & Sons; 1998
91. Vaara M, Nurminen M. Outer membrane permeability barrier in *Escherichia coli* mutants that are defective in the late acyltransferases of lipid A biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1459-1462
92. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2474-2478
93. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000;88:308-316
94. Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J Appl Bacteriol* 1994;76:626-631
95. Nafisi S, Hajiakhoondi A, Yektadoost A. Thymol and carvacrol binding to DNA: model for drug-DNA interaction. *Biopolymers* 2004;74:345-351
96. Aydin S, Basaran AA, Basaran N. Modulating effects of thyme and its major ingredients on oxidative DNA damage in human lymphocytes. *J Agric Food Chem* 2005;53:1299-1305
97. Meister A, Bernhardt G, Christoffel V, Buschauer A. Antispasmodic activity of *Thymus vulgaris* extract on the isolated guinea-pig trachea: discrimination between drug and ethanol effects. *Planta Med* 1999;65:512-516
98. Boskabady MH, Aslani MR, Kiani S. Relaxant effect of *Thymus vulgaris* on guinea-pig tracheal chains and its possible mechanism(s). *Phytother Res* 2006;20:28-33
99. Marsik P, Kokoska L, Landa P, et al. In vitro inhibitory effects of thymol and quinones of *Nigella sativa* seeds on cyclooxygenase-1- and -2-catalyzed prostaglandin E2 biosyntheses. *Planta Med* 2005;71:739-742

100. Industrie Bdc. Thymol: Toxikologische Bewertung. In. Heidelberg: Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie (BG Chemie); 2000
101. Kohlert C, van Rensen I, Marz R, et al. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. *Planta Med* 2000;66:495-505
102. Bonjar GH. Inhibition of Clotrimazole-resistant *Candida albicans* by plants used in Iranian folkloric medicine. *Fitoterapia* 2004;75:74-76
103. Imdorf A, Bogdanov S, Kilchenmann V, Maquelin C. Apilife VAR - Ein Varroabekämpfungsmittel mit dem Hauptwirkstoff Thymol. In: Schweizerisches Zentrum für Bienenforschung, Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld, CH-3003 Bern; 1994
104. Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J Agric Food Chem* 2000;48:2576-2581
105. Rasooli I, Owlia P. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry* 2005;66:2851-2856
106. Ultee A, Gorris LG, Smid EJ. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *J Appl Microbiol* 1998;85:211-218
107. Botelho MG. Fractional inhibitory concentration index of combinations of antibacterial agents against cariogenic organisms. *J Dent* 2000;28:565-570
108. R. Di Pasqua, G. Betts, N. Hoskins, et al. Membrane Toxicity of Antimicrobial Compounds from Essential Oils. *J Agric Food Chem* 2007;55:4863-4870

## Lebenslauf

Name: ITEN

Vorname: Felix

Geburtsdatum: 01.05.1958

Heimatort (Kanton): Unterägeri (ZG)

Ausbildung: Feinmechaniker (Landis & Gyr, Zug, 1974 – 1978)  
AKAD in Zürich (1983 – 1988),  
Eidgenössischer Maturitätsprüfung Typus C (1988)

Studium: Biologiestudium, Universität Zürich (1989 – 1994)  
Diplomfach: Pflanzenphysiologie  
Titel der Diplomarbeit: «Versuche zur Messung von  $Mg^{2+}$ -Dechelata-seaktivität mit Chlorophyllin als Substrat»

Doktorandenstelle: Am Institut für Naturheilkunde des UniversitätsSpital  
Zürich seit: 2005

Anstellung: Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für  
Naturheilkunde des UniversitätsSpital Zürich (50%)  
seit: 2000

Stipendien: Forschungsbeitrag der «Stiftung für Komplementär-  
medizin», Keltengasse 40, 8044 Zürich

## **Publikationen**

Iten F, Saller R.  
Thymian – Arzneipflanze 2006  
Schweiz. Zschr. GanzheitsMedizin 2006;18:393-399

Iten F, Saller R, Abel G, Reichling J.  
Additive antimicrobial effects of the active components of the essential oil of  
Thymus vulgaris--chemotype carvacrol.  
Planta Med 2009;75:1231-1236

## **Poster und Abstracts**

### **Poster**

Iten F, Saller R, Abel G, Reichling J.  
Additive antimicrobial effects of the active components of the essential oil of  
Thymus vulgaris--chemotype carvacrol.  
57<sup>th</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal  
Plant and natural Product Research - 16<sup>th</sup> to 20<sup>th</sup> August 2009 Geneva,  
Switzerland

### **Abstract**

Iten F, Saller R, Abel G, Reichling J.  
Additive antimicrobial effects of the active components of the essential oil of  
Thymus vulgaris--chemotype carvacrol.  
Planta Med 2009(9)75:1055



## Dank

Mein herzlicher Dank geht an alle, die mich während der Entstehungszeit der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

- Herrn **Prof. Dr. Jürgen Reichling** für die theoretische und praktische fachliche Unterstützung und die anregenden Diskussionen.
- Herrn **Prof. Dr. med. Reinhard Saller** für die Idee zu dieser Arbeit und die Ermutigungen sie in Angriff zu nehmen.
- Frau **Dr. Gudrun Abel** von der Firma Bionorica für die Organisation der finanziellen Unterstützung, sowie für die Bereitstellung der Extrakte und die anregenden Diskussionen.
- Herrn **Prof. Dr. Enrico Martinoia** für die Bereitschaft sich als Doktorvater zur Verfügung zu stellen.
- Herrn **Prof. Dr. Beat Meier** für sein Engagement bei der Suche eines geeigneten Laborplatzes und .
- Frau **Prof. Dr. Corinne Gantenbein-Demarchi** für ihre Bereitschaft mir einen Laborplatz zur Verfügung zu stellen.
- Frau **Dr. Johanna Buschmann** für ihre fachliche Beratung bei den Fragen zur Chemie der Phenolate.
- **Christiane König** (Dipl. Biologin) war mir dank ihrer eigenen langjährigen Erfahrungen als Mikrobiologin immer wieder eine grosse Hilfe. Sie hat meine Übersetzungen korrigiert und als Partnerin hat sie mir die Kraft gegeben, diese Arbeit zu Ende zu führen.